



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica.

Tesis Doctoral

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO SOBRE LA EXPRESIÓN Y
DISTRIBUCIÓN DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1
EN EL CÁNCER COLORRECTAL.**

Doctorando: Carlos Escudero Severín.

Tutora: Prof^a. Dra. María Carmen Garnacho Montero.

Directores: Dr. Miguel Muñoz Sáez, Dr. Juan Manuel Segura Sánchez.

A mi mujer e hijos

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

D. Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Médico español. Premio Nobel de Medicina 1906

Agradecimientos:

Al Dr. Miguel Muñoz y Dra. Carmen Garnacho por ayudarme a alcanzar los conocimientos científicos para poder culminar este trabajo por su paciencia que ha demostrado conmigo, por transmitirme su saber, y animarme a lo largo de estos años cuando faltaban fuerzas.

A mi amigo y compañero el doctorado D. Luis Gabriel Luque Romero porque sin su apoyo personal, profesional y técnico, esta obra no se hubiera concluido nunca.

A Juan, mi compañero y amigo que ha compartido conmigo todo este proceso, por no tener en cuenta mis ausencias, por su cuidado, su paciencia, su cariño, su ánimo en los momentos bajos y su impulso diario para llegar al final de este trabajo.

A D. Daniel Arenas Jiménez por su ayuda técnica en la preparación de las muestras y a todo el personal de la Sección de Anatomía Patológica y del laboratorio del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe siempre con una sonrisa y adaptándose a mis necesidades.

A D^a Rosario Vigo Ortega, enfermera de investigación por su apoyo y ayuda en la elaboración de algunas partes de este manuscrito.

A mis padres por darme la vida y a mis hermanos por darme la energía necesaria para acabar este trabajo.

A María del Mar por su ayuda, paciencia y aliento en los momentos malos y buenos que hemos pasado durante la elaboración de esta obra. A mis hijos Blanca y Carlos por haberles robado tiempo cuando más lo necesitaban. Siempre han estado a mi lado y me han dado su cariño a pesar de haberles faltado en algunos momentos esenciales para ellos.

A todos los que llevo en mi corazón, y que me han prestado su mano desinteresada para poder acabar este trabajo.

Abreviaturas

<i>AECC</i>	Asociación Española contra el Cáncer
<i>ACCENT</i>	Adjuvant Colon Cancer Endpoints
<i>ADN</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>AJCC</i>	American Joint Committee on Cancer
<i>AMP</i>	Association for Molecular Pathology
<i>ARN</i>	Ácido Ribonucleico
<i>ASCO</i>	American Society of Clinical Oncology
<i>ASCP</i>	American Society for Clinical Pathology
<i>CAP</i>	Colegio Americano de Patólogos
<i>CCR</i>	Cáncer Colorrectal
<i>CCRHNP</i>	Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico
<i>CEA</i>	Carcinoembryonic Antigen
<i>cm</i>	centímetros
<i>COX2</i>	Ciclooxigenasa-2
<i>CP</i>	Carcinomatosis Peritoneal
<i>CTA</i>	Células Tumorales Aisladas
<i>DM</i>	Diabetes Mellitus
<i>DTE</i>	Depósitos Tumorales Extramurales
<i>DV</i>	Densidad Vascular
<i>ECMC</i>	Escisión Completa del Mesocolon
<i>EGFR</i>	Receptor del factor de Crecimiento epidérmico.
<i>EII</i>	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
<i>EMS</i>	Estabilidad de Microsatélites
<i>ESMO</i>	European Society for Medical Oncology
<i>FM</i>	Fenotipo metilador de islas cpg
<i>GCO</i>	The Global Cáncer Observatory
<i>GPCRs</i>	Receptores acoplados a proteínas G
<i>GRKs</i>	Quinasas de receptor acoplada a proteínas G
<i>H-E</i>	Hematoxilina Eosina
<i>HR</i>	Hazard Ratio
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alto rendimiento.
<i>IARC</i>	Agency for Research on Cancer
<i>IC</i>	Intervalo de Confianza
<i>ICC</i>	Inmunocitoquímica
<i>IG</i>	Índice Ganglionar
<i>IHQ</i>	Inmunohistoquímica
<i>ILV</i>	Invasión Linfovascular

<i>IMC</i>	Índice de Masa Corporal
<i>IMS</i>	Inestabilidad de Microsatélites
<i>IPN</i>	Invasión Perineural
<i>IVE</i>	Invasión Venosa Extramural
<i>IVI</i>	Invasión Venosa Intramural
<i>LMR</i>	Lymphocyte-to-Monocyte Ratio
<i>LND</i>	Lymph Node Distribution
<i>kDa</i>	Kilodalton
<i>mm</i>	milímetros
<i>MMR</i>	Mismatch Repair
<i>MMWG</i>	Molecular Modellers Working Group
<i>MRC</i>	Margen de Resección Circunferencial
<i>NCCN</i>	National Comprehensive Cancer Network
<i>NCI</i>	National Cancer Institute
<i>ng/ml</i>	nanogramos / mililitros
<i>NK1-R</i>	Receptor NK1
<i>NK2-R</i>	Receptor NK2
<i>NK3-R</i>	Receptor NK3
<i>NK4-R</i>	Receptor NK4
<i>NLR</i>	Neutrophil-to- Lymphocyte Ratio
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>PAF</i>	Poliposis Adenomatosa Familiar
<i>PCR</i>	Proteína C Reactiva
<i>PET-CT</i>	Positron Emission Tomography-Computed Tomography
<i>PLR</i>	Platelet-to-Lymphocyte Ratio
<i>REDECAN</i>	Red Española de Registros de Cáncer
<i>RER</i>	Replication Errors
<i>RM</i>	Resonancia Magnética
<i>RT-PCR</i>	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<i>SEER</i>	The Surveillance, Epidemiology, and End Results
<i>SEOM</i>	Sociedad Española de Oncología Médica
<i>SG</i>	Supervivencia Global
<i>SGEC</i>	Supervivencia Global Específica por Cáncer
<i>SLE</i>	Supervivencia Libre de Enfermedad
<i>SP</i>	Sustancia P
<i>TC</i>	Tomografía Computarizada
<i>TGFα</i>	Factor de crecimiento transformante α
<i>TK</i>	Taquicinas
<i>UICC</i>	International Union Against Cancer
<i>WHO</i>	World Health Organization

ÍNDICES

1	INTRODUCCIÓN.....	21
1.1	ANATOMÍA	23
1.2	HISTOLOGÍA.....	24
1.3	EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD.....	29
1.4	EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE COLON	35
1.4.1	<i>Diagnóstico histopatológico:.....</i>	<i>37</i>
1.4.2	<i>Estadaje del CCR</i>	<i>38</i>
1.4.3	<i>Secuencia adenoma-carcinoma.....</i>	<i>40</i>
1.4.4	<i>Clasificación diagnóstica y pronóstica del CCR.....</i>	<i>45</i>
1.5	TRATAMIENTO DE CCR	100
1.6	EPIDEMIOLOGÍA.....	113
1.6.1	<i>Prevalencia</i>	<i>115</i>
1.6.2	<i>Incidencia</i>	<i>116</i>
1.6.3	<i>Mortalidad y supervivencia</i>	<i>118</i>
1.7	LA SP Y EL RECEPTOR NK-1R	130
1.7.1	<i>Generalidades de la SP/NK-1R.....</i>	<i>130</i>
1.7.2	<i>Neuronas y neurotransmisores.</i>	<i>132</i>
1.7.3	<i>Neuropéptidos:.....</i>	<i>134</i>
1.7.4	<i>Taquicininas.....</i>	<i>137</i>
1.7.5	<i>Receptores taquicinérgicos:.....</i>	<i>142</i>
1.7.6	<i>Sustancia P</i>	<i>150</i>
1.7.7	<i>Fisiopatología</i>	<i>156</i>

1.8	JUSTIFICACIÓN Y PERTINENCIA	173
1.10	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	180
1.11	HIPÓTESIS.....	180
1.13	OBJETIVOS.....	185
1.13.1	<i>General</i>	185
1.13.2	<i>Específicos</i>	185
3	MATERIAL Y MÉTODOS	189
3.1	DISEÑO.....	189
3.2	ÁMBITO	189
3.3	PERIODO DE ESTUDIO.....	189
3.4	POBLACIÓN	189
3.4.1	<i>Criterios de selección</i>	190
3.4.2	<i>Muestra</i>	192
3.5	VARIABLES DE ESTUDIO	193
3.5.1	<i>Dependientes</i>	193
3.5.2	<i>Independientes</i>	193
3.6	FUENTES DE DATOS	193
3.7	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	194
3.7.1	<i>Preparación de muestras y realización de los cortes</i>	194
3.7.2	<i>Construcción de una matriz de tejidos (Tissue Micro Arrays. Tma)</i>	195
3.7.3	<i>Método IHQ</i>	196
3.7.4	<i>Valoración e interpretación de los resultados</i>	199
3.7.5	<i>Limitaciones de los instrumentos de medida</i>	200
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	200

3.8.1	<i>Análisis univariante</i>	201
3.8.2	<i>Análisis bivalente (inferencial)</i>	202
3.8.3	<i>Análisis de supervivencia</i>	204
3.8.4	<i>Análisis multivariante</i>	205
3.9	CONSIDERACIONES BIOÉTICAS	207
5	RESULTADOS	211
5.1	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	211
5.2	EXPRESIÓN DE LA SP Y NK1-R	218
5.3	ANÁLISIS BIVARIANTE	225
5.4	ANÁLISIS MULTIVARIANTE	231
6	DISCUSIÓN	243
6.1	LIMITACIONES Y SESGOS	267
6.2	INVESTIGACIONES FUTURAS RELACIONADAS CON LOS ANTAGONISTAS DEL NK1-R	270
7	CONCLUSIONES	275
8	BIBLIOGRAFÍA	279
9	ANEXOS	304
9.1	ANEXO I: CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN	304
9.2	ANEXO II: TABLA DE DEFINICIÓN DE VARIABLES.	305

Índice de figuras

FIGURA 1. CURVA DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) A 5 AÑOS (KAPLAN-MEIER) SEGÚN LA EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN K-RAS.	235
FIGURA 2. CURVA DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) A 5 AÑOS (KAPLAN-MEIER) SEGÚN LA PRESENCIA DE INVASIÓN PERINEURAL.	236
FIGURA 3. CURVA DE SUPERVIVENCIA GENERAL ESPECÍFICA DEL CÁNCER (SGEC) A 10 AÑOS (KAPLAN-MEIER) SEGÚN LA EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN K-RAS.	238

Índice de ilustraciones

ILUSTRACIÓN 1. CLASIFICACIÓN R PARA TUMOR RESIDUAL, TRAS TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.	39
ILUSTRACIÓN 2. ESQUEMATIZACIÓN DE LA INESTABILIDAD Y ESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES, SEGÚN EL ESTADO DEL SISTEMA DE REPARACIÓN DE ERRORES DEL ADN.	71
ILUSTRACIÓN 3. INCIDENCIA DE CÁNCER POR SEXO (REDECAM 2015).	116
ILUSTRACIÓN 4. VÍAS DE ACCIÓN DE LA SP (TOMADO DE MUÑOZ M, COVEÑAS, R, ESTEBAN F, Y REDONDO M; 2015). ..	132
ILUSTRACIÓN 5. IMÁGEN DE UNA NEURONA.	133
ILUSTRACIÓN 6. DIFERENCIAS ENTRE NEURONA AMINÉRGICA Y PEPTIDÉRGICA.	135
ILUSTRACIÓN 7. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LOS GENES HUMANOS PPTA (TAC1), PPTB (TAC3) Y PPTC (TAC4). Los EXONES DE CADA UNO DE LOS GENES ESTÁN EXPRESADOS POR NÚMEROS.	140
ILUSTRACIÓN 8. ESQUEMA DEL MODO DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G.	143
ILUSTRACIÓN 9. IMAGEN TRIDIMENSIONAL DE LA MOLÉCULA DE SP.	151
ILUSTRACIÓN 10. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MECANISMO MOLECULAR EN LA COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS NERVIOSAS Y MASTOCITOS.	160
ILUSTRACIÓN 11. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN SP/NK1-R (TOMADO DE ROSSO ET AL., 2012).	161

ILUSTRACIÓN 12. PAPEL Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA SP/NK-1R A NIVEL NUCLEAR TANTO EN LA INFLAMACIÓN COMO EN LA PROGRESIÓN, ANGIOGÉNESIS Y MIGRACIÓN TUMORAL.	162
ILUSTRACIÓN 13. PAPEL Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA SP/NK-1R A NIVEL CITOPLÁSMICO TANTO EN LA INFLAMACIÓN COMO EN LA PROGRESIÓN, ANGIOGÉNESIS Y MIGRACIÓN TUMORAL.	162
ILUSTRACIÓN 14. MECANISMOS DE ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DEL COMPLEJO SP/NK-1R.	164
ILUSTRACIÓN 15. VENTAJAS, BENEFICIOS Y EVENTOS ADVERSOS ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON ANTAGONISTAS DE NK-1R.	172
ILUSTRACIÓN 16. APARATO DE INCLUSIÓN AUTOMATIZADA.	194
ILUSTRACIÓN 17. IMÁGEN DE SLIDE TMA COLON.	195
ILUSTRACIÓN 18. EQUIPO AUTOMATIZADO PARA IHQ.	198
ILUSTRACIÓN 19. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE IMS. A) TINCIÓN NEGATIVA (INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES); B) TINCIÓN POSITIVA (ESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES).	218
ILUSTRACIÓN 20. TINCIÓN IHQ DE SP: A) TINCIÓN CITOPLÁSMICA DIFUSA DE INTENSIDAD MODERADA Y B) TINCIÓN CITOPLÁSMICA GRANULAR DE INTENSIDAD FUERTE. EN AMBAS SE APRECIA LA TINCIÓN RETICULAR A NIVEL NUCLEAR. VER NÚCLEOS NEGATIVOS EN LAS CÉLULAS NEUROENDOCRINAS (FLECHAS).	219
ILUSTRACIÓN 21. TINCIÓN IHQ DE NK1-R: A) TINCIÓN DE MEMBRANA/CITOPLÁSMICA DE INTENSIDAD MODERADA Y B) TINCIÓN MEMBRANA/CITOPLÁSMICA DE INTENSIDAD FUERTE. EN AMBAS SE APRECIA LA TINCIÓN NEGATIVA A NIVEL NUCLEAR.	223

Índice de tablas

TABLA 1. CLASIFICACIÓN MODIFICADA DE ASTER-COLLER (MAC).	96
TABLA 2. ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE INCIDENCIAS POR CCR EN 2018 DE ESPAÑA, COMUNIDAD EUROPEA (EU-28) Y EUROPA.	117

TABLA 3. ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE MORTALIDAD POR CCR EN 2018 PARA ESPAÑA, COMUNIDAD EUROPEA Y EUROPA EN GENERAL.....	120
TABLA 4. ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA POR CCR EN 2018 PARA ESPAÑA Y EUROPA (NO DISPONEMOS DE LOS DATOS DE EU-28).....	120
TABLA 5. SECUENCIA LINEAL DE AMINOÁCIDOS DE LAS TAQUICININAS.	138
TABLA 6. ESTRUCTURA Y DISPOSICIÓN TRANSMEMBRANA DE LOS RECEPTORES NK1, NK2 Y NK3. CONSTAN DE 407, 398 Y 452 RESIDUOS DE AMINOÁCIDO, RESPECTIVAMENTE; SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANA, CON UN EXTREMO AMINO EXTRACELULAR Y UN EXTREMO CARBOXILO TERMINAL INTRACELULAR.....	145
TABLA 7. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS.	212
TABLA 8. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS.	213
TABLA 9. ESTRATIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS SEGÚN LA CLASIFICACIÓN TNM ANATOMOPATOLÓGICA. BASADO EN LA PATHOLOGIC STAGE CLASSIFICATION (PTNM, AJCC 8TH EDITION).	216
TABLA 10. DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS POR ESTADIO CLÍNICO (UIJJ).....	217
TABLA 11. INTENSIDAD DE LA INMUNOTINCIÓN PARA SP EN CITOPLASMA Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS TUMORALES DEL ADENOCARCINOMA COLORRECTAL.	219
TABLA 12. EXTENSIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN CONTRA SP EN CITOPLASMA Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS TUMORALES DEL ADENOCARCINOMA COLORRECTAL.	220
TABLA 13. PUNTUACIÓN GLOBAL (ALLRED) DE LA INMUNOTINCIÓN CONTRA SP EN CITOPLASMA Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS TUMORALES DEL ADENOCARCINOMA COLORRECTAL.	220
TABLA 14. INTENSIDAD DE LA INMUNOTINCIÓN CONTRA NK1-R EN CITOPLASMA DE LAS CÉLULAS TUMORALES DEL ADENOCARCINOMA COLORRECTAL.	221
TABLA 15. EXTENSIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN CONTRA NK1-R EN CITOPLASMA DE LAS CÉLULAS TUMORALES DEL ADENOCARCINOMA COLORRECTAL.	221
TABLA 16. PUNTUACIÓN GLOBAL (ALLRED) DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA NK1-R.....	222
TABLA 17. NIVELES SÉRICOS DE CEA A LO LARGO DEL PERIODO DE SEGUIMIENTO.....	224

TABLA 18. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE SLE Y SGEC A 1, 5 Y 10 AÑOS	224
TABLA 19. INTENSIDAD DE LA INMUNOTINCIÓN EN EL TEJIDO TUMORAL Y TEJIDO NORMAL CON ANTICUERPOS ANTI SP Y NK1-R.	225
TABLA 20. EXTENSIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN EN EL TEJIDO TUMORAL Y TEJIDO NORMAL CON ANTICUERPOS ANTI SP Y NK1-R.	226
TABLA 21. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SP Y EL NK1-R ENTRE EL TEJIDO NORMAL Y TUMORAL	226
TABLA 22. DISTRIBUCIONES DE LA EXPRESIÓN DE LA SP Y NK1-R SEGÚN EL GRADO DE INVASIÓN DEL TUMOR (PT DE LA CLASIFICACIÓN TNM).	227
TABLA 23. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE EL GRADO DE DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA Y EL GRADO DE EXPRESIÓN DE SP / NK1R	228
TABLA 24. EXPRESIÓN GLOBAL DE SP Y NK1-R DEPENDIENDO DE LA PRESENCIA DE INFLAMACIÓN PERITUMORAL.	228
TABLA 25. PUNTUACIÓN GLOBAL (ALLRED) DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE SP/NK1R DEPENDIENDO DE LA EXISTENCIA DE INVASIÓN PERINEURAL.....	229
TABLA 26. PUNTUACIÓN GLOBAL (ALLRED) DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE SP/NK1-R DEPENDIENDO DE LA EXISTENCIA DE METÁSTASIS A DISTANCIA.	230
TABLA 27. PUNTUACIÓN GLOBAL (ALLRED) DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE SP/NK1-R DEPENDIENDO DE LA EXISTENCIA DE RECIDIVA LOCAL.	230
TABLA 28. MODELOS UNIVARIANTES DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX (CADA VARIABLE CONSTITUYE UN MODELO POR SEPARADO) (SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD [SLE] A 10 AÑOS).	231
TABLA 29. MODELOS BIVARIANTES DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX (SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD [SLE] A 10 AÑOS). VARIABLE PRINCIPAL: EXPRESIÓN NK1-R DE LAS CÉLULAS TUMORALES.....	232
TABLA 30. MODELOS BIVARIANTES DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX (SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD [SLE] A 10 AÑOS). VARIABLE PRINCIPAL: EXPRESIÓN DE K-RAS LAS CÉLULAS TUMORALES.....	233

TABLA 31. MODELOS MULTIVARIANTES DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX (SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD [SLE] A 10 AÑOS). VARIABLE PRINCIPAL: EXPRESIÓN DE K-RAS LAS CÉLULAS TUMORALES.....	234
TABLA 32. MODELOS MULTIVARIANTES DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX (SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD [SLE] A 10 AÑOS). VARIABLE PRINCIPAL: EXPRESIÓN DE K-RAS LAS CÉLULAS TUMORALES.....	236
TABLA 33. MODELOS UNIVARIANTE DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX (SUPERVIVENCIA GENERAL ESPECÍFICA DEL CÁNCER [SGEC] A 10 AÑOS). VARIABLE PRINCIPAL: EXPRESIÓN DE K-RAS LAS CÉLULAS TUMORALES.	237

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer de colorrectal (CCR) constituye un problema de salud de enorme magnitud, que viene determinado por su elevada incidencia, morbilidad y por la carga socio-sanitaria que implica.

La Sustancia P (SP) es un péptido de cadena corta (11 aminoácidos) que ejerce su actividad biológica a través de la unión con su receptor específico Neurokinin 1 Receptor (NK1-R). Está ampliamente distribuida por todo el organismo estando la mayor proporción en el sistema nervioso central y periférico. En la progresión neoplásica, objeto de nuestro estudio, el sistema SP/NK1-R muestra una sobreexpresión variable actuando tanto como neurotransmisor como neuromodulador (acción mitogénica y anti apoptótica) en múltiples sistemas biológicos a nivel general (1).

El sistema SP/NK1-R juega un importante papel en el desarrollo del cáncer y en su progresión. La SP induce la proliferación, la migración de las células tumorales y la neoangiogénesis mientras que los antagonistas del receptor NK-1R ejercen una acción anti proliferativa, bloquean la migración de células tumorales e inhiben la angiogénesis así pues ejercen una acción antitumoral dependiente de la concentración. Esta acción es independiente de la estructura química pero aparentemente relacionada con la afinidad por el receptor NK1-R. A la luz de estos hallazgos, el receptor NK1-R es un prometedor candidato a ser una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer colorrectal

(CCR) induciendo la muerte celular por apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon (2). La mayoría de los CCR son adenocarcinomas de tipo intestinal no específico (80 %). Un porcentaje menor de casos, entorno al 10-20%, muestran alteraciones genéticas. Este estudio relaciona el binomio SP/NK1-R con los distintos parámetros clínico-patológicos relacionados con el CCR su progresión y supervivencia. El sistema SP/NK1-R está implicado por igual en todos los CCRs o actúa de manera diferente en los que muestran alteraciones genéticas; para responder a esta pregunta existe un grupo de CCRs con alteraciones genéticas que muestran inestabilidad de microsatélites (IMS) y que tienen una prevalencia del 10-20 %. Estos tumores se caracterizan por mutaciones/epimutaciones en los genes del sistema *MMR* (siglas en inglés, genes reparadores) que son genes implicados en la reparación del material genético.

La IMS son alteraciones de secuencias de longitud corta y repetitiva de nucleótidos (microsatélites) en el ADN tumoral en comparación con el ADN normal. En realidad, la IMS es reflejo de la existencia de una alteración del sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN, que está encargado de corregir los fallos que se producen durante la replicación del ADN, y es regulada por varios genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, entre otros). La alteración de este sistema conduce a la acumulación de alteraciones de los microsatélites, que están distribuidos a lo largo de todo el genoma(3).

Se ha demostrado en distintos ensayos clínicos que la administración de antagonistas del receptor NK1-R no causa importantes efectos secundarios como por ejemplo el uso de antagonistas del receptor NK1-R en la clínica para el tratamiento de la emesis tumoral podría tener una acción antitumoral y ser en el futuro usados para el tratamiento del CCR. El presente trabajo podría colaborar a orientar con el estudio de distintos parámetros clínicos, histopatológicos y moleculares en la selección de distintos subgrupos de pacientes con CCR investigando si pueden ser mejores candidatos a la utilización de antagonistas del NK1-R(4).

1.1 ANATOMÍA

El intestino grueso comprende la parte final del tubo digestivo se inicia a partir de la válvula ileo-cecal siendo su longitud variable entre 120-160 cm y se divide a su vez en ciego, colon y recto. El colon posee una parte ascendente, una transversa, una descendente, además del colon sigmoides. Del ciego nace el apéndice ileo-cecal, de unos 5 a 13 cm de longitud, donde se acumulan muchos nódulos linfáticos situado anatómicamente en fosa iliaca derecha. El colon ascendente o colon derecho se extiende hasta el ángulo hepático mide 15 cm de longitud conectando con el colon transverso que se extiende hasta el ángulo esplénico y mide aproximadamente 50 cm. Por último, el colon descendente conecta con el colon sigmoideo y se sitúa anatómicamente en el lado izquierdo del abdomen y mide 10 cm de longitud. El colon sigmoideo se

extiende desde el descendente hasta la reflexión peritoneal donde comienza el recto 8-15 cm. que entra en la pelvis y conecta a través del ano el tubo digestivo con el exterior. La zona donde el intestino grueso desemboca a través de unión ano-rectal en el ano. Aquí se produce la transición desde epitelio de tipo intestinal a epitelio estratificado plano queratinizado y como en todas las áreas de la economía es un lugar donde a veces asientan neoplasias. A este nivel existe un engrosamiento de la musculatura externa que forma el esfínter anal interno. También hay un esfínter externo formado por musculatura estriada (5).

La vascularización arterial proviene de la arteria ileo-cólica que se divide en cinco ramas: a) cólica ascendente que sube por el colon ascendente, b) cecal anterior c) cecal posterior y la arteria apendicular. Otras ramas de la arteria mesentérica superior salen hacia el ángulo derecho del colon, la arteria cólica derecha y finalmente para la parte proximal del colon transversal la cólica media que se anastomosa con la anterior.

El drenaje venoso es bastante similar a cargo de la vena mesentérica inferior y la vena esplénica.

1.2 HISTOLOGÍA

El intestino grueso no tiene vellosidades intestinales ni pliegues circulares. Al igual que el resto del tracto digestivo, la pared del intestino grueso consta de

cuatro capas mucosa, submucosa, muscular que es doble y dependiendo de la relación con el peritoneo de una serosa y una suberosa o de una adventicia.

La mucosa está formada por glándulas mucosas tubulares tapizadas por epitelio simple cilíndrico. Éstas aparecen como invaginaciones de la superficie epitelial. Una de las principales funciones del intestino grueso es la reabsorción de agua y electrolitos del proceso digestivo las realizan las células absortivas o enterocitos de citoplasma eosinófilo no contienen moco. Entre los enterocitos se sitúan las células caliciformes que secretan una gran cantidad de moco por exocitosis. Las vesículas de moco se muestran con la H-E ya que el moco se tiñe con las técnicas de rutina como citoplasmas vacíos, aunque podemos ponerlos de manifiesto realizando la técnica de PAS. La función de estas células es favorecer el tránsito de los deshechos semisólidos no digeridos a través del intestino. Las células mucosas o caliciformes son más abundantes en el epitelio del intestino grueso que en el del intestino delgado. La proporción entre células mucosas y células absorbentes, denominadas enterocitos, cambia de 4 a 1 en las porciones más próximas al intestino delgado a 1:1 en las zonas más próximas al ano (6).

Las células epiteliales se renuevan constantemente: nacen en la base de las criptas y van desplazándose hacia la luz del tubo digestivo donde mueren, este proceso suele durar unos 5 días. Los linfocitos y ocasionales eosinófilos están presentes en las zonas superficiales del epitelio y pueden ocasionar vacuolas apoptóticas que contienen detritus celulares y restos nucleares. El

patólogo no debe confundir estas células apoptóticas con neutrófilos que en algunas patologías se encuentran en la superficie del epitelio colónico.

El epitelio de las criptas contiene además una población heterogénea de células que no existen en la superficie. Contienen además de las células absorptivas y mucosas, otras como son las células endocrinas y células de Paneth. Estas células endocrinas contienen gránulos eosinofílicos visibles en secciones de H/E de buena calidad que se identifican muy bien con tinciones de Plata. El otro tipo de células son las células de Paneth que corresponden a células secretoras de forma piramidal que normalmente se encuentran en el ciego y en la parte proximal del colon derecho. La presencia de las mismas en otros tramos del colon indica un proceso metaplásico usualmente secundario a un proceso inflamatorio (7). La función de las criptas colónicas es renovar la superficie epitelial que se va exfoliando constantemente a la luz por un proceso de muerte celular programada conocida como apoptosis.

La lámina propia es similar a la del resto del tubo digestivo con sólo unas pocas peculiaridades como son la carencia de vasos linfáticos en la parte superior de la lámina propia quedando limitados a la parte inferior (superior de la muscularis mucosae), el conocimiento de este detalle histológico es muy importante para entender el frente de avance del cáncer. La lámina propia muestra una capa gruesa de colágeno entre la membrana basal del epitelio y los vasos sanguíneos próximos. Contiene células plasmáticas con cromatina en forma de rueda de carro producen sobre todo Ig A. También contiene linfocitos

en especial del tipo T supresores que participan en los procesos inmunológicos. Los linfocitos pueden organizarse en folículos linfoides confinados en la lámina propia o en la submucosa conformando complejos linfo-glandulares que no deben de ser confundidos con procesos patológicos. En la lámina propia pueden encontrarse además células mieloides (eosinófilos y mastocitos) que ocasionalmente pueden por exocitosis llegar a la superficie colónica. Sin embargo, los neutrófilos no suelen estar presentes en la superficie ni en las criptas a no ser que exista alguna patología como por ejemplo en las colitis microscópicas tipo colitis linfocíticas en las que los pacientes (generalmente mujeres) tienen abundante diarrea mucosa. Otro tipo de células presentes en la lámina propia son los fibroblastos que se distribuyen en dos localizaciones unos en la lámina propia y otros rodeando las criptas (pericrípticos) que son de morfología fusiforme y son los encargados de producir colágeno. Los macrófagos también son comunes en la lámina propia siendo importantes en la presentación de los antígenos y en la fagocitosis. A veces se visualizan muy bien por la existencia en su interior de un pigmento marrón que representa el depósito de laxantes antraquinónicos denominándose a este fenómeno *melanosis coli*, o también estar ocupados por hemosiderina como se ve en los procesos isquémicos crónicos. La presencia de un suficiente número de macrófagos patológicos ocupando la lámina propia pueden representar una infección por *Mycobacterium avium-intracelulare* y varios desordenes del metabolismo en

algunas enfermedades por depósito. Se identifican además células neuroendocrinas fuera de la membrana basal de las criptas (6).

La muscularis mucosa normalmente se organiza en dos capas de músculo liso con distinta orientación y separa la mucosa de la parte profunda de la submucosa a veces son más numerosas en las zonas de tracción de la mucosa por ejemplo cuando hay prolapso mucoso / ulcera rectal solitaria. El grosor de la misma es variable y normalmente está atravesada por complejos linfoglandulares, canales vasculares y fascículos neurales.

La submucosa está formada por tejido conectivo muy denso compartiendo los mismos componentes celulares que la lámina propia. Contiene vasos sanguíneos de gran calibre que a veces son tortuosos sobre todo si el colon esta contraído y puede confundirse con anomalías vasculares. Contiene además dos plexos neurales uno inmediatamente debajo de la muscularis mucosae conocido como el plexo submucoso de Meissner que contiene neuronas, células gliales, fibroblastos y un segundo plexo el de Henle en la parte profunda de la submucosa. Se identifican linfáticos que son de vital importancia ya que en carcinomas de tipo intestinal sobre pólipos generalmente adenomatosos si el tumor invade el pedículo ya es capaz de invadir los vasos linfáticos y diseminarse a los ganglios linfáticos siendo éste un factor muy importante a la hora de decidir la conducta terapéutica de estos enfermos (3).

La capa muscular se organiza de forma distinta. Existe una capa longitudinal externa de músculo liso que es más delgada que la capa circular interna. Variaciones estructurales han sido identificadas quizás condicionadas por la diferente motilidad y áreas de depósito de las diferentes regiones colónicas. El plexo vascular de Auerbach se sitúa entre las dos capas musculares con las mismas características descritas en el plexo de Meissner. La capa muscular es perforada por vasos y linfáticos y englobada en la subserosa ya que la verdadera serosa es la que esta revestida por mesotelio. Este es un concepto que es importante tener claro por las implicaciones que tiene en el manejo de los pacientes con cáncer así una neoplasia puede infiltrar las capas musculares sin superar la serosa y entrar en el espacio subseroso pero lo que cambia el estadiaje y por tanto el tratamiento en CCR es que supere el mesotelio de la serosa (6).

1.3 EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

Ante un paciente con clínica sospechosa de CCR debemos realizar una historia clínica completa, solicitar colonoscopia y una tomografía computarizada (TC). Sin embargo, la colonoscopia es la prueba “*gold standard*” para el diagnóstico del CCR, ya que nos permite la confirmación histológica del tumor y la exploración del resto del colon. El estudio preoperatorio de un paciente con sospecha de CCR incluye:

-Historia Clínica: en ella deben constar los antecedentes familiares y personales, una buena anamnesis, y una exploración completa incluyendo siempre la exploración abdominal y en el tacto rectal.

-Bioquímica de sangre: debe incluir un hemograma con conteo de hematíes, hematocrito, hemoglobina, recuento y fórmula leucocitaria, plaquetas así como una bioquímica con estudio de coagulación, ferritina y transferrina (en caso de anemia microcítica), glucosa, urea, creatinina, sodio, potasio, calcio, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FA), transaminasas, albúmina y antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorio que es el marcador tumoral de referencia usado de rutina para el CCR . El CEA es un instrumento muy adecuado además para el seguimiento del CCR, pero teniendo en cuenta que un 20% de dichos cánceres no producen CEA. Los niveles séricos de CEA tienen una sensibilidad entre 65 y 95% en la detección de recurrencia antes de su detección clínica. En caso de que exista una anemia microcítica hay que solicitar un estudio de sangre oculta en heces, esta es una de las exploraciones principales en el cribado del CCR. Existen otros marcadores sanguíneos en el CCR una reciente revisión sistemática de la literatura en los últimos cinco años revela la existencia de cuatro grupos de marcadores los ácidos nucleicos (NEAT_v2 *non coding* RNA, SDC2 *methylated* DNA y SEPT9 *methylated* DNA), citoquinas en especial la Interleukina 8 y proteínas circulantes (Ca11-19 glicoproteína y DC-Sign/DC-SignR) siendo de todas ellas la más estudiada SEPT9 y el resto tan solo caracterizadas en pequeños grupos de estudio. (8)

-Colonoscopia. Es la exploración de elección cuando es completa, es decir cuando se alcanza el ciego, lo que ocurre en el 74-96% de los casos. Esto es debido a que permite diagnosticar no solo los CCR sino también pólipos, incluso los de pequeño tamaño, inferiores a 5 mm de diámetro. También detecta los tumores sincrónicos que se presentan en un 5% de los casos. Aparte, permite realizar tomas de biopsia para obtener confirmación histopatológica del tumor y exéresis de un alto porcentaje de pólipos, tanto pediculados como sésiles. Requiere una limpieza exhaustiva del colon mediante la administración oral de soluciones evacuadoras o enemas de limpieza. Cuando no es posible alcanzar el ciego por estenosis u obstrucción de la luz intestinal, o por problemas técnicos, o está contraindicada por perforación se debe de realizar entre los tres y seis primeros meses tras la cirugía con objeto de identificar lesiones sincrónicas. La sensibilidad de la colonoscopia para la detección del CCR es del 95% (9,10).

-Enema opaco de doble contraste. Está indicado cuando la colonoscopia no ha podido ser completa. La sensibilidad del enema de doble contraste para diagnosticar lesiones malignas es del 89%. El enema opaco convencional (es el que no se inyecta aire tras la expulsión de la papilla) es superior al enema con doble contraste para diagnosticar lesiones malignas en el colon y recto.

-Colonoscopia virtual o Colonografía-TC. Se trata de la técnica más moderna y novedosa no disponible en la rutina en la mayoría de los centros como en el nuestro, está indicada cuando la colonoscopia no ha alcanzado el ciego y se sospecha que pueda haber un CCR. Es especialmente sensible en la

detección del CCR sintomático llegando hasta el 96%. La sensibilidad de la prueba para la detección de pólipos es heterogénea en función del tamaño de los pólipos varía entre el 48 y 85%. En contraste, la especificidad es mayor alcanzando según el tamaño hasta el 97% (11).

Una vez realizado el diagnóstico clínico y la confirmación histopatológica del CCR, hay que evaluar el grado de extensión de la enfermedad para planificar el tratamiento más adecuado.

-Ecografía abdominal. Es la primera exploración a realizar ante una masa abdominal palpable. Presenta una sensibilidad y una especificidad del 95% para confirmarla o excluirla, y de un 88-91% en cuanto a determinar el origen de dicha masa. También permite detectar metástasis hepáticas de pequeño tamaño. Detecta lesiones mayores de 1 cm con una sensibilidad del 90%. En la práctica clínica hoy en día no es una prueba habitual ya que ante la sospecha de CCR se solicita TC toraco-abdominal que aporta más información de la existencia de metástasis hepáticas y pulmonares siendo la prueba de elección.

-TC abdomino-pélvico: mediante esta prueba podemos estudiar el grado de afectación regional del tumor, su extensión linfática y metástasis a distancia con lo que podemos realizar el estadiaje del paciente con CCR y evaluar las distintas opciones terapéuticas; además nos aporta información sobre las posibles complicaciones regionales relacionadas con el tumor (obstrucción, perforación, fístulas, etc.). La sensibilidad del TC para la detección de metástasis

a distancia es mayor (75 - 87%) que para la detección de la afectación de los ganglios loco-regionales (45 - 84%) o la profundidad de la invasión transmural (aproximadamente el 50%). La sensibilidad del TC para la detección de implantes peritoneales depende de la ubicación y el tamaño de los implantes. La sensibilidad de la TC para los nódulos < 0,5 cm se sitúa en torno al 11% y del 37% para los implantes de 0,5 a 5 cm. Aunque el TC abdomino-pélvico preoperatoria en pacientes con CCR suele ser una prueba diagnóstica de rutina su necesidad en todos los pacientes se cuestiona.(12) La evaluación de existencia de posibles metástasis hepáticas por ecografía intraoperatoria y palpación manual del hígado puede proporcionar un mejor rendimiento que la TC preoperatoria. Sin embargo, esta práctica puede estar limitada por el abordaje laparoscópico del tumor y la imposibilidad técnica de palpación manual del hígado en algunas situaciones(3).

-Eco-endoscopia rectal. Permite determinar con precisión las capas de la pared rectal, por lo que está indicada en los tumores de esta localización para evaluar el grado de infiltración en profundidad, logrando así una estadificación local del tumor y de los ganglios perirrectales. El grado de infiltración de la pared rectal evaluado con esta prueba tiene una precisión del 80-95, superior a la TC y Resonancia Magnética (RM). A pesar de estas ventajas hay que tener en cuenta la variabilidad inter observador y la curva de aprendizaje.

-TC de tórax: su beneficio para una clasificación clínica de rutina en pacientes con CCR es también cuestionado. Teóricamente, puede tener más

valor en el caso del cáncer de recto, ya que el drenaje venoso de la parte inferior del recto se realiza a través de las venas hemorroidales a la vena cava, sin pasar por el hígado y las metástasis pulmonares podrían ser más comunes. El principal problema es el hallazgo frecuente de lesiones indeterminadas (10- 30%), que rara vez son malignas (7-20%)(13).

-Resonancia Magnética (RM) : tiene gran utilidad en especial en el estadiaje de los tumores rectales(14). Nos da información sobre la extensión longitudinal del tumor, el grado de infiltración y penetración del tumor en la pared rectal y en especial del estado del mesorrecto, la relación del nivel del tumor con la reflexión peritoneal de vital importancia para la indicación quirúrgica, las adenopatías de la grasa perirrectal en la medida de lo posible dependiendo del tamaño y la señal que emitan, de las estructuras osteomusculares y neuro-vasculares así como órganos pélvicos de vecindad(15). Es útil en la detección preoperatoria de invasión vascular extramural. También permite valorar la existencia de metástasis a distancia.

11- Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET-TC). No está indicada de rutina en el preoperatorio del paciente con CCR. La única ventaja es que nos ofrece una información metabólica del tumor que nos ayudará en el futuro a evaluar posibles recurrencias con esta técnica de imagen(15).

1.4 EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE COLON

Según los principios de la anatomía patológica y la biología celular (16) los crecimientos epiteliales en el colon pueden dividirse en aquellos cambios neoplásicos sin crecimiento invasor y por tanto sin potencial para metastatizar (carcinoma in situ) de aquellos con crecimiento invasor y capacidad de metastatizar (carcinoma invasor o infiltrante). En el CCR, hay condiciones especiales que son de gran importancia, porque los tumores con invasión solamente de la mucosa (incluida la lámina propia), y a pesar de constituir un crecimiento infiltrante intramucoso, no tienen potencial de metastatizar puesto que no alcanzan los linfáticos. Puesto que las metástasis sólo pueden esperarse cuando el tumor ha superado por lo menos la submucosa, sólo en este momento, o estadio de infiltración, podemos llamar carcinoma a la neoplasia. Hasta entonces, se recomienda la utilización del término adenoma con displasia epitelial de alto grado, que sería equivalente al término de carcinoma in situ o intraepitelial. El CCR es un cáncer del colon o del recto siendo uno de los tumores más comunes en el mundo. El CCR se extiende frecuentemente al hígado o a los ganglios linfáticos intestinales. Esa diseminación de células cancerosas a través del sistema linfático o el flujo sanguíneo se llama metástasis. En los estadios tempranos de la enfermedad, la cirugía puede tener efecto curativo. Sin

embargo, los síntomas del CCR son a menudo imprecisos y la concienciación de la población en torno a la enfermedad es baja(17).

El CCR es una enfermedad avanzada al diagnóstico, con una historia clínica corta, y que se presenta a veces como una urgencia quirúrgica, estando este último hecho ligado, de una forma estadísticamente muy significativa, a un peor pronóstico. A ello hay que añadir, y este es uno de los hechos más dramáticos, el que después de tantos esfuerzos empleados en mejorar la supervivencia al CCR, y a pesar de los progresos en el conocimiento de la etiopatogenia y en el perfeccionamiento de los medios de diagnóstico precoz, ésta se mantiene estable, en torno al 50%, en los últimos 30 o 40 años .(18) Este hecho obliga a dirigir los esfuerzos de investigación y manejo del problema hacia el campo de la terapéutica, tanto en la mejora de los tratamientos coadyuvantes a la cirugía, como en sus indicaciones, lo que implica una adecuada evaluación pronóstica personalizada , no sólo post-operatoria sino también pre-operatoria(17).

Debido a la dificultad del diagnóstico precoz del CCR donde tan solo el estudio de sangre oculta en heces ha demostrado su eficacia, una forma de mejorar la supervivencia de los pacientes sería intentar disminuir la tasa de recidivas y procurar su resección curativa cuando aparezcan. Con los rápidos avances en esta era de la medicina personalizada el papel del patólogo en el manejo de los pacientes con CCR se ha visto incrementado partiendo de la morfología tradicional del diagnóstico histológico, el estadiaje patológico, el

estudio de los márgenes quirúrgicos, búsqueda de parámetros pronósticos que no están incluidos en el estadiaje como son la invasión linfovascular y perineural a valorar los efectos terapéuticos en los pacientes que han recibido terapia neoadyuvante. Además, el patólogo tiene un papel central al analizar las características histopatológicas de los tumores que son sugestivos de IMS siendo los encargados de seleccionar el tejido apropiado para el test de IMS y para el análisis de mutaciones para KRAS y BRAF e interpretar estos importantes test de valor pronóstico y terapéutico.

1.4.1 Diagnóstico histopatológico:

Ante la sospecha clínica de la existencia de un CCR hay que realizar una colonoscopia, con toma de biopsias, que nos permiten obtener una confirmación histológica. Entre los rendimientos de la biopsia de colon y recto podríamos mencionar los siguientes:

1. Confirmar al clínico peticionario y cirujano la existencia de un cáncer.
2. Evitar falsos positivos, en situaciones de endometriosis colorrectal, diverticulosis complicada y Enfermedad Inflamatoria Intestinal, como la Enfermedad de Crohn.
3. Informar de la estirpe histológica, es decir, de la naturaleza del cáncer, en el sentido de si se trata de adenocarcinoma de tipo intestinal convencional y el grado histológico o si bien se trata de otra extirpe como el neuroendocrino (en

especial tras radioterapia previa por ej en el cáncer de próstata), linfoma, sarcomas (GIST) entre otros.

4. También añadir información sobre otros parámetros que pueden tener transcendencia en el manejo quirúrgico y oncológico del caso como son la presencia de invasión vascular o infiltración perineural

5. Desde el punto de vista de las nuevas técnicas de patología molecular el material biopsico preoperatorio permite analizar aspectos como presencia de oncogenes, ploidía del ADN e índice de proliferación celular(19).

1.4.2 Estadíaje del CCR

En el manejo clínico del paciente con CCR el diagnóstico debe de hacerse antes de que se inicie el tratamiento a no ser que se trate de una urgencia como a veces sucede en pacientes obstruidos y/o perforados. A pesar de los avances en las técnicas de imagen, la histopatología proporciona todavía el diagnóstico más fiable. El patólogo debe no sólo conocer e identificar los tumores, sino también clasificarlos (20). Este hecho ha alcanzado una creciente importancia en los últimos años, ya que la oncología clínica intenta individualizar el tratamiento en relación con la situación de cada caso concreto. De aquí, que la caracterización correcta de los tumores tenga gran importancia:

Los parámetros utilizados que tienen más importancia son:

1.- Clasificación histopatológica.

- 2.- Determinación del grado histológico de diferenciación.
- 3.- Determinación de la extensión anatómica del tumor o estadio.
- 4.- Confirmación de la presencia o ausencia de tumor residual tras el tratamiento o clasificación R.

Clasificación R para tumor residual, tras tratamiento quirúrgico:

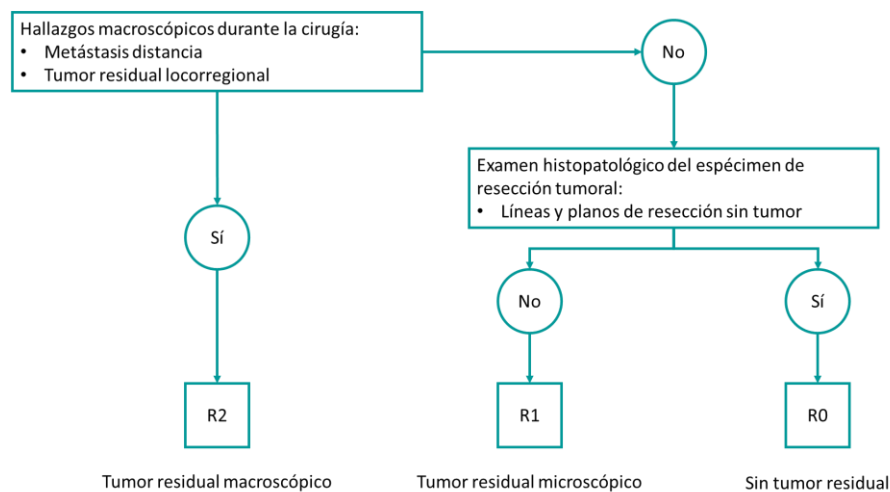


Ilustración 1. Clasificación R para tumor residual, tras tratamiento quirúrgico.

El tipo y grado histológico tienen gran trascendencia a la hora de tomar la decisión sobre un tratamiento a realizar así pues puede ser una intervención limitada como una polipectomía endoscópica o una escisión quirúrgica local. Si se trata de tumores de alto grado histológico, indiferenciados y de células pequeñas, así como en casos en los que se comprueba invasión linfática, existe un riesgo significativo de que hayan tenido lugar ya metástasis a los ganglios

loco-regionales, de tal forma que las técnicas limitadas pueden utilizarse sólo en casos incurables, como los determinados por existencia de metástasis a distancia, o en aquellos pacientes con un estado general muy pobre. Las indicaciones para un tratamiento postoperatorio con radio o quimioterapia se ven influidas por el conocimiento del nivel de invasión de la neoplasia en el informe de anatomía patológica y de la existencia o no de tumor residual (clasificación R). Además, la selección de pacientes con un riesgo elevado de recidivas locales y/o a distancia es de gran importancia (17).

El riesgo se puede determinar con más fiabilidad utilizando la clasificación del tipo histológico de grado y estadio en el contexto clínico. Se pueden esperar recidivas locales especialmente cuando ha habido perforación inadvertida del tumor, en casos de alto grado histológico, diseminación linfática extensa (pN2/3), e invasión extensa del tejido perirrectal, así como cuando hay una distancia mínima entre el margen tumoral y la superficie serosa /mesocolónica del tejido pericólorrectal en especial en las piezas quirúrgicas de recto. Hay riesgo elevado de metástasis a distancia en tumores de alto grado y cuando hay evidencia de invasión extramural, especialmente de venas de pared gruesa macro y microscópica así como en los casos de diseminación linfática extensa. (21)

1.4.3 Secuencia adenoma-carcinoma

Antes de entrar en el estudio del carcinoma es muy importante conocer y recordar el papel de los pólipos colorrectales que son el caballo de batalla en la

práctica diaria y cuya compresión nos ayuda a entender los esfuerzos en la lucha contra esta enfermedad. Los pólipos son sobreelevaciones respecto del nivel de la mucosa, determinadas por múltiples procesos patogénicos. Se pueden dar como elementos únicos o formando pequeños grupos de dos o tres pólipos, o bien en el contexto de una poliposis, en la que aparecen como múltiples (22).

En tanto que su potencial de malignización depende de su naturaleza histológica, es conveniente clasificarlos en tres grandes grupos: hamartomatosos o hiperplásicos, inflamatorios y adenomatosos.

Los adenomas (por su morfología pueden ser tubulares, vellosos y túbulo-vellosos y de morfología plana) tanto cuando aparecen como elementos aislados, o en pequeños grupos, como sobre todo cuando constituyen cuadros de poliposis, los de mayor potencial de malignización son los adenomas y en menor medida los hiperplásicos, juveniles y de Peutz-Jeghers.

El adenoma suele tener la forma macroscópica de un elemento polipoide, pero puede aparecer como elemento plano (en especial en colon derecho) ya que no determina sobreelevación de la mucosa colónica (adenoma plano), lo que por otra parte dificulta su visualización macroscópica endoscópica. El potencial maligno de los adenomas reside en factores como son el tamaño, la presencia de pedículo, patrón vellosos y grado de displasia. El tamaño es el predictor de malignidad más sencillo y práctico. Los pólipos inferiores a 6 mm no tienen prácticamente riesgo de presentar CCR infiltrante. Los pólipos entre 1 y 2 cm de

diámetro tienen un riesgo del 5% de albergar ya CCR, y este riesgo supera el 10% en los pólipos mayores de 2 cm de diámetro. El pedículo: más del 50% de los pólipos sésiles tienen alto riesgo de malignidad, que contrasta con el 10% de riesgo existente en los pediculados. La arquitectura vellosa: los adenomas vellosos tienen más probabilidad de malignizarse que los tubulares. Displasia epitelial: a mayor grado de displasia epitelial más posibilidad de malignización.

(23)

El potencial de malignización de los adenomas se da en la Poliposis Adenomatosa Familiar, que es una enfermedad genéticamente determinada, debida a una mutación en un gen dominante no ligado al sexo, situado en el cromosoma 5, el gen APC (Adenomatous Poliposis Coli) (24). En esta enfermedad, la mucosa colorrectal está ocupada por cientos, o miles, de adenomas, que, dejados a su evolución natural, determinan en el 100 % de los casos, la aparición de uno o varios adenocarcinomas. De esta enfermedad hay asociaciones sindrómicas como las referidas por Gardner, Turcot y Muir-Torre.

Resulta pues evidente que la lesión con mayor riesgo de originar un CCR es el adenoma, este hecho suscitó la teoría de la denominada “Secuencia Adenoma-Carcinoma”, que sostiene que los adenomas pueden dar lugar a CCR, y que, si no todos, la mayoría de estos se originarían por malignización de adenomas.

Algunas de las bases de esta afirmación que sustentan esta hipótesis son las siguientes:

1. La coexistencia de CCR y adenoma. Cuando el CCR es solitario, se da esta asociación en el 25 % al 30% de los casos.

2. Cuando el CCR es sincrónico (aparición simultánea de dos o más carcinomas), la coexistencia con adenomas se da en el 75 % de los casos.

3. La posibilidad de desarrollar CCR metacrónico (otro carcinoma que aparece años más tarde de haber padecido y curado el primer CCR) en otra parte del colon, es mayor si existe algún adenoma en el espécimen quirúrgico inicialmente resecado. La posibilidad de desarrollar otros adenomas o cáncer metacrónico es más alta si en el examen inicial del colon extirpado había más de un pólipo.

4. El riesgo acumulado de desarrollar CCR en pólipos del colon no resecado, es del 2,5% a los cinco años, del 8% a los diez años y del 24% a los veinte años.

5. Algunos CCR conservan zonas marginales de adenoma residual.

6. En algunos adenomas podemos ver signos de micro invasión constituyentes de formas incipientes de CCR, que se habrán originado en un tumor que en su mayor extensión es todavía un adenoma.

7. Coincidencia de localización geográfica y anatómica. La incidencia de adenomas es más alta precisamente en las áreas geográficas en las que se da más CCR. Por otra parte, los adenomas son más frecuentes precisamente en las regiones del colon donde el CCR es también más frecuente.

8. Modelo experimental animal: en los estudios de carcinogénesis colorrectal experimental por Dimetilhidracina en la rata Sprague-Dawley, se ha comprobado cómo primeramente aparecen adenomas, que con el tiempo se malignizan.

Recordar además las Enfermedades Inflamatorias Intestinales especialmente la Colitis Ulcerosa y en menor medida la Enfermedad de Crohn. Los pacientes con Colitis Ulcerosa que tiene un alto riesgo de Cáncer serían aquellos en los que la enfermedad tiene estas características: comienzo temprano en la vida del paciente, larga evolución, distribución pan colónica y gravedad clínica atenuada, aunque en nuestro país la aparición de CCR en el contexto de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal es prácticamente anecdótica(24).

Los pacientes operados y curados de CCR previo, tienen mayor riesgo de padecer un segundo CCR (carcinoma metacrónico).

El CCR hereditario no asociado a poliposis (25). Se trata de un CCR heredofamiliar en el que no hay pólipos como precursor potencial del mismo y del que se describen tres tipos:

- A. CCR hereditario de localización específica o Síndrome de Lynch I. Es un CCR precoz, de aparición alrededor de 45 años de edad, con mayor tendencia a la localización en colon derecho, múltiple y de mejor pronóstico que el CCR habitual.
- B. Síndrome de cáncer familiar o Síndrome Lynch II. Consiste en la conjunción de las características del Síndrome de Lynch I y la aparición de carcinomas en otros miembros de la familia, localizados en útero, ovario, estómago.
- C. Síndrome del adenoma plano hereditario. Se trata de una variedad del CCR hereditario sin poliposis, pero de comienzo más tardío, alrededor de 55 años. Se presenta con adenomas planos múltiples, en menor número. Los adenomas son planos, no polipoides, y en menor número que los habitualmente presentes.(24)

1.4.4 Clasificación diagnóstica y pronóstica del CCR

1.4.4.1 Evolución del CCR

Se puede intentar predecir la supervivencia global y, por extensión, de cada caso concreto de CCR analizando una serie de factores como son el grado histológico y estadio, que además aportan información útil para su manejo oncológico, lo cual puede influir, y a veces decisivamente, en la supervivencia última de cada caso, ya que se está viendo que el tratamiento oncológico (quimio

y radioterapia), pre y postoperatorio pueden modular positivamente, en algunos, casos dicha evolución.

Estos factores de grado y estadio son algunas de las herramientas necesarias para la individualización o adecuación del seguimiento a las características individuales de cada caso en los comités de tumores de cada centro (reunión para análisis y toma de decisiones sobre los casos individuales del cáncer constituidos por gastroenterólogos, radiólogos, cirujanos, patólogos y oncólogos. En estos comités se consensuan la mejor pauta terapéutica y de seguimiento de cada caso. Un ejemplo de esto es la creación de Planes Integrales Operativos Locales (PIOL) cuyos objetivos son la estandarización de la atención a los pacientes con cáncer digestivo que incluye en colorrectal en las distintas áreas geográficas de sistema Sanitario Público Andaluz.

1.4.4.2 Parámetros pronósticos

1.4.4.2.1 Extensión local del tumor

La extensión local de la enfermedad (es decir, la profundidad de la invasión del tumor en la pared intestinal) influye de forma independiente en la supervivencia. Los tumores T4 son aquellos que invaden el peritoneo visceral por extensión directa a través de la pared y que pueden llegar a invadir directamente a otros órganos y estructuras vecinas. Esta categoría es la que más variaciones ha sufrido a lo largo del tiempo.

Es interesante destacar los resultados obtenidos en el estudio SEER (*Surveillance, Epidemiology and end Results Program*) del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en una cohorte amplia de pacientes con CCR. En dicho estudio, los autores concluyeron que los pacientes con invasión del peritoneo visceral tenían una supervivencia a los 5 años de un 10-20% mejor que los pacientes con afectación de órganos vecinos, independientemente de la afectación ganglionar. Por este motivo, la categoría T4 ha cambiado en la 8ª edición de la clasificación del TNM, quedando como T4a aquellos tumores que invaden únicamente el peritoneo visceral y como T4b cuando el tumor está adherido o invade otros órganos o estructuras vecinas. La determinación histológica de la penetración del tumor en la serosa es difícil, y la interpretación conservadora puede conducir a subestimar la enfermedad. Shepherd et al observaron que el examen citológico de raspado de la serosa revela células malignas hasta en el 26% de los tumores definidos histológicamente como pT3(26). El manual de la AJCC sugiere múltiples niveles de sección y / o la preparación de bloques adicionales de tejido para evaluar si la afectación de la serosa es por extensión directa del tumor o mediante un proceso inflamatorio, cualquiera de las dos situaciones se clasifica como T4a. El pronóstico de un tumor que se aproxima a la serosa (<1mm) no está claro, algunos autores como Pnarelli et al, sugieren que el riesgo de recurrencia peritoneal es mayor. (27)

Shepherd et al. han clasificado la relación del tumor con la superficie peritoneal en tres grupos histológicos:

- Tumor cerca de la serosa con una reacción inflamatoria y / o hiperplasia mesotelial.
- Tumor cerca la serosa con una reacción inflamatoria, hiperplasia mesotelial, y/o erosión o ulceración.
- Células tumorales libres en la serosa peritoneal con ulceración subyacente del peritoneo visceral.

Estas tres formas de afectación del peritoneo local son las que definen la categoría pT4a y se ha demostrado que cualquiera de los tres hallazgos influye de forma negativa en el pronóstico de los pacientes con CCR. La existencia de células libres en la serosa es la situación asociada a mayor riesgo de desarrollar recurrencia peritoneal y/o persistencia. Sin embargo, cuando existen dudas en cuanto al grado de extensión del tumor, la asignación de un grado menor estaría justificado según reglas generales de la AJCC. En el caso de segmentos de colon y recto no cubiertas por peritoneo (por ejemplo, la zona posterior del colon ascendente y descendente, porción inferior del recto), la categoría T4a no es aplicable(26).

1.4.4.2.2 Tamaño y configuración del tumor

El tamaño del tumor ha sido un factor estudiado a lo largo de los años, concluyendo que no ejerce un impacto significativo en el pronóstico de los pacientes con CCR. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que el

tamaño del tumor puede ser un factor pronóstico negativo en pacientes con cáncer de colon, pero no en pacientes con cáncer de recto. La configuración del tumor en el borde de crecimiento tiene un papel en el pronóstico de los pacientes con CCR independiente del estadio. Específicamente, se ha demostrado que un patrón irregular de crecimiento frente a un borde de expansión regular es un factor pronóstico adverso independiente, aunque algunos han recomendado que la evaluación patológica de la configuración del borde del tumor sea descrita de forma rutinaria en el informe de anatomía patológica y que se incluya en el estadiaje del CCR es necesario demostrar su importancia pronostica con estudios con criterios estandarizados en cuanto al análisis histopatológico en el contexto de un análisis multivariante(24). Según los datos tomados de la última a clasificación TNM 2017 del informe del Colegio Americano de Patólogos la presencia de células individuales o pequeños grupos de menos de cinco células en el frente de avance del tumor se considera como “ budding tumoral “ Numerosos estudios han demostrado que la incipiente existencia de “ budding tumoral “ en adenocarcinomas que surge en pólipos es un factor de riesgo significativo para la afectación ganglionar y el brote tumoral es el factor más significativo en algunos estudios. De forma similar, el pronóstico adverso de una tumoración con budding tumoral elevada se ha demostrado en pacientes en estadio II y se ha recomendado su inclusión como un factor de alto riesgo para tomar decisiones de quimioterapia para pacientes en estadio II. En la literatura se han seguido diferentes criterios para evaluar e informar brotes / budding

tumoral. En 2016, una conferencia internacional de consenso sobre tumores (ITBCC) recomendó los siguientes criterios para evaluar la gemación tumoral:

(1) Los recuentos de brotes tumorales deben realizarse en las secciones de H & E. En casos de factores obstructivos como la inflamación, se puede obtener inmunohistoquímica para la queratina para evaluar el borde de avance de las yemas tumorales, pero la puntuación debe realizarse en las secciones de H & E.

(2) El brote del tumor debe informarse seleccionando un "punto de acceso" elegido después de la revisión de todos los portaobjetos disponibles con tumor invasivo. El número total de brotes se debe informar en un área que mide 0,785 mm², que corresponde al campo 20x en algunos microscopios (utilice la conversión adecuada para otros microscopios).

(3) Se debe informar tanto el número total de brotes como el puntaje de tres niveles (basado en el área de campo de 0.785 mm²): bajo (0-4 brotes), intermedio (5-9 brotes) y alto (10 o más brotes).

No es un elemento requerido obligatorio pero es recomendable reportarlo en los cánceres que aparecen en pólipos en los estadios I y II en el según la revisión más reciente del TNM de 2017(28).

1.4.4.2.3 Afectación de los ganglios regionales

La afectación loco-regional de los ganglios linfáticos es uno de los parámetros más importantes que determinan la evolución y el pronóstico de los pacientes con CCR tras la resección del mismo, después de la existencia de metástasis a distancia. La diseminación ganglionar es una indicación de tratamiento adyuvante, tanto en el cáncer de colon como en el de recto. En pacientes con CCR, se ha demostrado que la existencia de afectación ganglionar regional se relaciona tanto con el grado de diferenciación histológica (29) la profundidad de la invasión transmural del tumor. El número de ganglios linfáticos afectados es un factor pronóstico importante (28). De esta forma observamos como en la clasificación TNM de 2010 y 2017 la afectación ganglionar se estadifica según el número de ganglios linfáticos afectados, en las categorías N1 y N2, independientemente de la categoría T. Además del número de ganglios afectados por el tumor, el número total de ganglios linfáticos extirpados con la pieza quirúrgica influye directamente en el pronóstico de la enfermedad en estadio II (ganglios negativos) y en estadio III (ganglios positivos).

Estudios recientes sugieren que el índice ganglionar (IG), la proporción de ganglios linfáticos metastásicos respecto a los ganglios examinados, es un factor pronóstico mejor que el número total de ganglios positivos. Una revisión sistemática reciente con 33 984 pacientes con CCR, concluyó que este índice es un factor predictor independiente de supervivencia global, supervivencia libre de

enfermedad y supervivencia específica por cáncer y que el valor pronóstico obtenido por el IG era superior al del número de ganglios positivos. A pesar de la discordancia entre los distintos estudios, los grupos de expertos recomiendan que deben ser examinados histológicamente al menos 12 ganglios para determinar con exactitud el estadio ganglionar. Desde el punto de vista del patólogo esta recomendación a veces no se correlaciona con la realidad en la práctica clínica pues ya está documentado y consensuado que las resecciones de recto postradioterapia no es posible alcanzar este número. Existe además una relación con el tipo de resección quirúrgica las dificultades técnicas. Este número mínimo de ganglios evaluados es importante para establecer la adecuada estadificación, el pronóstico y el posible tratamiento adyuvante. Hay que tener en cuenta que este punto de corte procede de estudios observacionales antiguos, en los que el número de ganglios linfáticos extirpados no se ajustó a variables como estadio T y el grado de diferenciación celular(24).

Hay que considerar además la extensión ganglionar extracapsular (la existencia de células tumorales a través de la capsula ganglionar hacia el tejido adiposo adyacente), ya que este hallazgo se asocia a un aumento del riesgo de mortalidad y recurrencia y debe ser reflejada en los informes de anatomía patológica aunque en mi experiencia esto no se realiza (30).

Otro aspecto es la distribución de los ganglios linfáticos metastáticos, *lymph node distribution* (LND). En la práctica clínica este parámetro es difícil de evaluar ya que el tallado macroscópico de las piezas quirúrgicas convencionales

no permite no permite adaptar el sistema de estadificación japonés se basa en la distribución de los ganglios linfáticos, en lugar del número absoluto de los ganglios linfáticos metastáticos y son pocos estudios han evaluado prospectivamente el impacto de la LND en la supervivencia de pacientes con CCR. En esta línea de estudio, Huh et al. Investigaron la importancia pronostica de la LND en pacientes con cáncer de colon sigmoide o el cáncer de recto, distinguiendo 4 grupos basados en la LND: 0 (ganglios linfáticos sin metástasis), 1 (metástasis en los ganglios pericólicos), 2 (metástasis en los ganglios intermedios) y 3 (ganglios metastáticos en el origen de la arteria mesentérica inferior). Estos autores concluyeron que LND es un factor predictor independiente de la supervivencia en los pacientes con CCR, pero no es predictor de la recidiva local y que la categorización de N incluyendo LND podría mejorar el valor pronóstico de la clasificación TNM para los pacientes con ganglios positivos con cáncer de sigma o de recto (24).

1.4.4.2.4 Depósitos tumorales extramurales (DTE)

La clasificación TNM en su edición de 2010 ha sido la primera que ha incorporado el termino depósitos tumorales para designar a nódulos tumorales de cualquier tamaño dentro de la grasa pericólica o perirectal o en el mesenterio adyacente. Se consideran equivalentes a las metástasis ganglionares (un ganglio linfático sustituido por un tumor), aunque no exista una arquitectura nodal residual, y entran en la clasificación directamente como enfermedad pN1c en

ausencia de metástasis en alguno de los ganglios linfáticos regionales identificados. Cada depósito tumoral debe ser contado por separado, y el número debe ser registrado en el informe de anatomía patológica. Sin embargo, el número de depósitos tumorales es independiente al número de ganglios positivos en la categoría N si alguno/s de ganglios regionales identificados es metastásico no sumatorio. La octava revisión y más reciente de la clasificación TNM aclara aún más la definición de depósitos de tumores. Se ha demostrado que la existencia de depósitos tumorales en pacientes con CCR es un factor pronóstico adverso (28).

1.4.4.2.5 Micrometástasis ganglionares

Existen controversias sobre la importancia pronóstica de las células tumorales aisladas (CTA) o micrometástasis en los ganglios regionales estando este parámetro aun no implementado en la práctica clínica, aunque existen ella en marcha estudios multidisciplinarios para la validación de esta técnica y sobre todo como en otros órganos de cara al estudio del ganglio centinela. La influencia de las CTA y las micrometástasis nodales ha sido bastante estudiada gracias al desarrollo de las técnicas utilizadas para aumentar la detección de los ganglios linfáticos, como la biopsia de ganglio centinela y las técnicas con inmunohistoquímica (IHQ) y *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) para detectar ácido ribonucleico (ARN) específico de tumor en los ganglios. (31) El uso de estas técnicas complementarias puede suponer un aumento en el

estadio de los pacientes con CCR que tienen ganglios histológicamente negativos. Sin embargo, la importancia biológica de estas micrometástasis no está clara. Siendo además un parámetro importante a evaluar el aumento de carga de trabajo técnica en Anatomía Patológica parámetro muy a tener en cuenta. Su detección ha demostrado poder influir en el pronóstico en algunos estudios, pero no en todos. Las diferencias se deben a la definición de CTA, ya que algunos autores consideran CTA no solo a las células tumorales aisladas en la zona subcapsular, sino también a los grupos de hasta 20 células tumorales o pequeños grupos celulares de dimensión $< 0,2\text{mm}$. (32) Por otra parte, las micrometástasis se definen como grupos de células tumorales que miden $>0,2\text{ mm}$. En la clasificación TNM 2010, las CTA y las micrometástasis no se consideran enfermedad ganglionar positiva. Las CTA, si son detectadas por técnicas histológicas o IHQ, se codifican como pN0 (i +) y si se han utilizado técnicas moleculares especiales como la RT-PCR se codifican como pN0 (mol+). Sin embargo, basándose en gran parte en el metaanálisis expuesto anteriormente, en la última revisión de la estadificación TNM, las micrometástasis ganglionares (grupos de tumores $> 0,2\text{ mm}$ de diámetro) son definidas como enfermedad nodal positiva, mientras que las células tumorales aisladas en la clasificación TNM 2018, las CTA pueden ser usadas pero no son necesarias y por tanto no se consideran enfermedad ganglionar positiva (30).

1.4.4.2.6 Márgenes tumorales

El estado de los márgenes tras la resección el tumor influye en el pronóstico de los pacientes con CCR. La resección incompleta del tumor es un factor pronóstico negativo. (33) La descripción de la enfermedad residual según el sistema de estadificación TNM (R0, R1 y R2) se define de la siguiente forma:

- **R0:** resección completa del tumor con todos los márgenes histológicamente libres.
- **R1:** resección incompleta del tumor con afectación microscópica de algún margen de resección.
- **R2:** resección incompleta del tumor con tumor residual macroscópico (tumor primario, ganglios regionales o afectación macroscópica del margen).

Se ha propuesto una clasificación R ampliada que tiene en cuenta la distancia mínima entre el tumor y el margen de resección, Sin embargo, estas modificaciones aún no han sido adoptadas por el AJCC, y no forman parte de la edición de 2010 ni de la edición 2017 del manual de estadificación TNM. Los márgenes de resección proximal y distal deben ser como mínimo de 5 centímetros (cm), y deben permitir una adecuada resección del segmento intestinal afectado con su drenaje vascular y linfático. En el caso de pacientes sometidos a hemicolectomía derecha, la longitud del íleon resecado no influye en las tasas de recurrencia local. En tumores de recto, el estado del mesorrecto

/ MRC (Margen Radial Circunferencial) es uno de los factores predictivos más importantes de recurrencia y supervivencia global. Los estudios sobre la influencia del MRC en el pronóstico de los pacientes con cáncer de colon son escasos pero su afectación implica una peor supervivencia global y específica por cáncer.

1.4.4.2.7 Localización del tumor.

Durante las últimas décadas ha habido un creciente interés en estudiar las diferencias en el pronóstico de los pacientes con CCR según la localización del tumor. Durante el desarrollo embrionario, el colon derecho (ciego, colon ascendente y dos tercios proximales del colon transversal) surge del intestino medio y el colon izquierdo (tercio distal del colon transversal, descendente, colon sigmoide y recto) del intestino posterior. Esta diferencia se refleja en la vascularización de cada segmento. Existen diferencias en la patología macroscópica entre los cánceres del lado derecho y del lado izquierdo. Los tumores del colon derecho son típicamente voluminosos, exofíticos y polipoides, que se proyectan a la luz causando anemia significativa; mientras que los cánceres del colon izquierdo son lesiones infiltrantes que constriñen la luz y conducen frecuentemente a la obstrucción. Actualmente, se ha demostrado en un metaanálisis de 66 estudios que los tumores localizados en el colon izquierdo tienen menor mortalidad específica por cáncer (Hazard Ratio [HR] 0.82 intervalo de confianza [IC] del 95%: 0.79 - 0.84) independientemente del estadio tumoral,

la raza, el uso de quimioterapia adyuvante, el año de estudio y la calidad de los estudios incluidos. Considerando que estudios recientes han descrito patrones distintos de biología molecular entre los cánceres que se originan en el colon derecho y los del colon izquierdo, en lo referente al estado de euploidía del ADN y la tasa de mutación de K-Ras y p-53 el efecto pronóstico de la localización del tumor podría ser simplemente un reflejo de la biología molecular. Sin embargo, el pronóstico favorable de tumores en colon izquierdo respecto a los tumores en colon derecho se ha demostrado en pacientes con RAS nativo. Así pues, pude que la clasificación molecular del CCR sea actualmente la más robusta desde el punto de vista biológico y debería ser la base para una futura clasificación clínica y para el desarrollo de tratamientos específicos para los distintos subtipos como ya se ha conseguido en otros tipos de tumores como por ejemplo en la mama(30).

1.4.4.2.8 Invasión linfática, venosa y perineural.

Además del estadio tumoral del sistema TNM AJCC/UICC, existen otros datos histopatológicos que ayudan a la toma de decisiones clínicas en relación con el seguimiento y selección del tratamiento adyuvante. Entre estos cabe resaltar el impacto pronóstico de la invasión venosa, linfática y perineural en el CCR. El CCR utiliza el drenaje linfático, venoso o el sistema nervioso de la pared intestinal para diseminarse a los ganglios linfáticos y a órganos distantes. La invasión venosa extramural que se caracteriza por la presencia de células

neoplásicas en vasos sanguíneos peri tumorales, más allá de la muscular propia.(28) Los vasos intramurales son de paredes más finas, de menor calibre y con menos fibras de elastina, definiéndose la invasión venosa intramural (IVI) como la invasión de los vasos venosos dentro de la pared del colon. Tanto la invasión venosa, particularmente de las venas extramurales, como la invasión linfática representan factores pronósticos adversos independientes. La IVI ha sido menos estudiada, pero un metaanálisis reciente afirma que la existencia de este hallazgo histopatológico se asocia a menor supervivencia. Hay una amplia dispersión en los porcentajes del diagnóstico con cifras que oscilan entre el 10 y el 89%, probablemente por los diferentes criterios utilizados para la identificación o debido a una selección de pacientes. Otros factores a considerar están vinculados a la cantidad de cortes histológicos que se realicen y a la experiencia del patólogo. Todos estos diferentes conceptos pueden llevar a un subregistro de la invasión venosa y determinar una estadificación incorrecta. El uso de técnicas de tinción especiales (además de la clásica hematoxilina-eosina) o de marcadores inmunohistoquímicos, de las células endoteliales (CD34) facilitan considerablemente la detección de la invasión vascular pero incrementan la carga de trabajo técnica y el gasto sin que existe una guía de consenso que separe la invasión linfática de la vascular ya sea intra o extravascular para su uso en la práctica clínica (30).

La existencia o ausencia de invasión venosa, linfática o ambos en conjunto (tumor en vasos pequeños no definidos ni como linfáticos ni como

vénulas) debe ser descrita en el informe de anatomía patológica de todos los tumores colorrectales donde el patólogo debe de buscarla en las distintas secciones que se realizan de cada tumor y si puede además definir si es de tipo intramural o extramural. La descripción de la invasión linfovascular es de suma importancia, ya que es uno de los factores clínico-patológicos incluidos en la definición de "alto riesgo" de cáncer de colon en etapa II de la ESMO (Sociedad Europea de oncología Médica). La presencia de estas características de alto riesgo influye en el uso de la quimioterapia adyuvante.

La invasión perineural es la presencia de células tumorales dentro, alrededor, o en cualquiera de las tres capas del nervio. Por definición las células tumorales deben rodear >33% de la circunferencia del nervio, aunque este concepto teórico es difícil de aplicar a la práctica diaria. La invasión perineural ha ido ganando cada vez más reconocimiento y actualmente existe evidencia de primer nivel se asocia a mal pronóstico en pacientes con CCR. Así pues es otro de los factores clínico-patológicos incluidos en la definición de cáncer de colon en estadio II de alto riesgo de la ASCO, NCCN y que influye en la decisión de tratamiento adyuvante y que el patólogo debe referir en su informe.

1.4.4.2.9 Grado de diferenciación tumoral y tipo histológico.

El grado histológico refleja el grado de diferenciación tumoral, es decir la capacidad de las células tumorales de parecerse a las glándulas normales en arquitectura y morfología celular. Se ha demostrado que es un factor pronóstico

independiente del estadio. Sin embargo, la clasificación del grado histológico es subjetiva, con una variabilidad dependiente del observador y además no existe un sistema de clasificación universalmente aceptado (29). El grado de diferenciación histológico poco diferenciado es una de las características utilizadas para definir la enfermedad de alto riesgo "II" por ASCO, NCCN y ESMO. Hay que tener en cuenta que los tumores con IMS son considerados por la OMS como tumores de bajo grado.

En un intento de reducir la variabilidad inter observador numerosos estudios han demostrado que un sistema de gradación binario con dos grados el bajo grado que engloba en bien y moderadamente diferenciado (50 % a más de formación de glándulas) y el alto grado (menos del 50 % de glándulas) sería más adecuado (29). Aunque es un tema en debate en general se considera al grado histológico como una variable pronóstica independiente del estadio. Así la histología con alto grado o pobremente diferenciado se asocia con corta supervivencia. Hay que enfatizar que el grado histológico solo se aplica al adenocarcinoma de tipo intestinal. Algunas variantes histológicas podrían mostrar una morfología de alto grado y comportarse como tumores de bajo grado en cuanto a sus características moleculares. La gran mayoría de carcinomas colorrectales se diagnostican en las biopsias o en las resecciones de las polipectomías con la excepción de unos pocos subtipos de alto grado (por ejemplo, anillo de sello, tumores mal diferenciados o no diferenciados). La variedad del carcinoma coloide de colon es un subtipo histológico caracterizado

por la producción de mucina (más del 50% de la masa tumoral porque si es menor se denomina adenocarcinoma de tipo intestinal con áreas coloides) con una incidencia del 5-15%. La mucina extracelular se extiende a través de la pared del tumor, ayudando a su extensión local. Aunque están claramente asociados con un pronóstico negativo, la influencia de un componente mucinoso extracelular no está claro. La determinación del tipo histológico y la respuesta inmune que describimos a continuación son dos parámetros que ponen en alerta al patólogo que puede solicitar técnicas de IMS que añadirían valor al informe de cara a la toma de decisiones por parte del equipo de oncología médica.

1.4.4.2.10 Respuesta inmune del huésped.

La mediación de la respuesta inflamatoria ha sido evaluada en varios tipos de tumores, entre ellos el CCR. Es bien conocido que el microambiente inflamatorio está en estrecha relación con el binomio SP/NK1-R objeto de nuestro estudio. Varios estudios han demostrado que la reacción linfocítica tumoral y las subpoblaciones de células T son biomarcadores pronósticos significativos, independientes del estadio tumoral, número de ganglios linfáticos y otros biomarcadores moleculares establecidos. La infiltración linfoide puede representar un marcador pronóstico favorable debido a su asociación con los CCR con alteraciones del sistema de reparación de errores de replicación del ADN. Los tumores que contienen numerosas células linfoides frecuentemente presentan un fenotipo mutador e IMS-alta. La relación entre la existencia de

infiltrado linfocitario tumoral y el pronóstico favorable de los tumores con IMS-alta es apoyada por estudios que muestran que las subpoblaciones de estas células están asociadas con un fenotipo molecular distinto. A pesar de estos datos, en la actualidad, la respuesta inmune del huésped no se considera un indicador pronóstico en la práctica clínica, aunque la incorporación de PD-L1 que es una proteína transmembrana que regula la respuesta inmune a través de dos receptores PD-1 y B7.1. La interrupción de esta vía representa una atractiva estrategia para incrementar la inmunidad tumoral específica mediada por Linfocitos T suprimiendo al expresión del PD-L1 en el microambiente tumoral (34).

1.4.4.2.11 Densidad vascular.

La densidad vascular es el reflejo de la angiogénesis inducida por la neoplasia y en el caso del CCR se ha asociado de forma independiente con una menor supervivencia en algunos estudios, pero existe una gran heterogeneidad en cuanto a los métodos de detención de la misma, lo que podría explicar los diferentes resultados obtenidos en los distintos estudios y es difícil de aplicar en la realidad.

1.4.4.2.12 Fibrosis peritumoral.

Una reacción desmoplásica es común en los CRC invasivos y es responsable de su consistencia dura típica. En algunos estudios, la fibrosis es

un factor pronóstico adverso independiente. Este parámetro no lo hemos relacionado con la SP y el NK1-R.

1.4.4.2.13 Calidad y estandarización de la técnica quirúrgica.

En el CCR, en las tres últimas décadas y la estandarización de la técnica quirúrgica ha permitido obtener importantes resultados, principalmente en la reducción de las recidivas locales. La cirugía del cáncer de colon apenas ha sufrido modificaciones hasta la última década. Los planos embriológicos no solo se limitan al mesorrecto, también existen en el resto del colon. El mesocolon está delimitado por la fascia visceral y tiene sus propios sistemas de drenaje vascular y linfático. Así, en los últimos años, promovido por el esfuerzo del grupo de Quirke ha surgido y se ha implantado el concepto de escisión completa del mesocolon (ECMc) contribuyendo a la estandarización de la técnica de resección cólica. Este análisis incluye el plano adecuado de escisión (submucoso, intramesocólico y mesocólico), el nivel de ligadura de los pedículos vasculares y el número de adenopatías aisladas. Se ha demostrado en varios estudios que el abordaje quirúrgico estándar de la ECMc junto con ligadura central de los pedículos vasculares se traduce en menores tasas de recidiva local y una mejor supervivencia.

Actualmente, distintos grupos multidisciplinares muestran un gran interés en la evaluación de la calidad de la cirugía del cáncer de colon a partir del análisis anatomopatológico de la pieza de resección (35) .

1.4.4.2.14 Otras características específicas del tumor

1.4.4.2.14.1 CEA preoperatorio

Los niveles preoperatorios del marcador tumoral CEA en suero tienen valor pronóstico en pacientes con CCR influyendo en estos niveles si el paciente es fumador o no, aunque el valor de corte óptimo es discutido. En varios estudios, los niveles de CEA = 5,0 nanogramos / mililitros (ng/ml) y en otros 3,0 nanogramos / mililitros (ng/ml) influyen de forma negativa en la supervivencia independientemente al estadio tumoral. También se ha observado que los pacientes con enfermedad ganglionar negativa y un nivel elevado de CEA preoperatorio tuvieron un peor pronóstico que aquellos con enfermedad ganglionar positiva y un nivel normal de CEA preoperatorio. Otros estudios sugieren que el nivel de corte de 3,0 ng / ml es el valor con mayor sensibilidad y especificidad para recurrencia. Independientemente al punto de corte, estos datos apoyan la idea sugerida por muchos autores de que el CEA preoperatorio debería ser incorporado al sistema de estadiaje TNM del cáncer de colon pero ni la clasificación TNM 2010 ni la revisión más reciente de 2017 incluyen el CEA preoperatorio, pero recomiendan que esta información sea recogida por su valor pronóstico, sobre todo para seguimiento postoperatorio de la recurrencia. Sin embargo, aunque los pacientes con ganglios negativos y un CEA preoperatorio elevado pueden considerarse que tienen mayor riesgo de recurrencia tras la cirugía, no existen datos que apoyen el beneficio de la quimioterapia adyuvante

en este contexto sin la existencia de otros factores de riesgo. Los niveles preoperatorios de CEA no se consideran uno de los factores clínico-patológicos que definen el cáncer de colon II de alto riesgo por ASCO, NCCN o ESMO.(8)

1.4.4.2.14.2 Obstrucción y / o perforación intestinal

La obstrucción y la perforación tumoral en el momento del diagnóstico se han relacionado de forma independiente con una menor supervivencia en pacientes con CCR. Las dos características clínico-patológicas son consideradas factores que definen el cáncer de colon II de alto riesgo de la NCCN y la ESMO, pero ASCO sólo considera la perforación como un factor de alto riesgo. La presencia de estas características de alto riesgo influye en la indicación de quimioterapia adyuvante (21).

1.4.4.2.14.3 Factores genéticos y moleculares

El valor pronóstico de una amplia variedad de marcadores moleculares ha sido estudiado en pacientes con CCR. Actualmente, son pocos los que se utilizan en la toma de decisiones en la práctica clínica, uno de los más frecuentemente solicitados es la deficiencia del complejo *MMR* (IMS). Otro marcador utilizado es el *KRAS*, las mutaciones de este gen predicen una falta de respuesta al tratamiento dirigido al receptor del *epidermal growth factor* (EGF) en pacientes con enfermedad metastásica. Y un tercer marcador son las mutaciones de *BRAF*, que tienen utilidad potencial como factor pronóstico y predictivo. La

American Society for Clinical Pathology (ASCP), el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), la *Asociation for Molecular Pathology (AMP)* y la *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* han publicado recientemente una guía actualizada sobre biomarcadores moleculares para el CRC (36).

1.4.4.2.14.4 Epigenética de la enfermedad neoplásica

Las células neoplásicas tienen tanto alteraciones epigenéticas como modificaciones genéticas que interactúan en todas las fases del desarrollo tumoral, permitiendo en su conjunto el progreso de la neoplasia. En cierta manera el CCR ha servido como modelo prototipo para el estudio de cambios genéticos y epigenéticos, debido al distinto rango de lesiones patológicas y a que los cambios epigenéticos persisten a lo largo de la progresión de la enfermedad (37).

La epigenética de la enfermedad neoplásica se caracteriza por la metilación del DNA, por la modificación de los patrones de las histonas y la alteración del perfil de expresión de las enzimas que modifican la cromatina.

Las modificaciones epigenéticas descritas inciden directamente en los genes implicados en el ciclo celular, en la reparación del DNA, en la angiogénesis, en la apoptosis, en la invasión y en la adhesión. Todas estas modificaciones provocan una pérdida de la regulación en la expresión genética que permite el desarrollo y la progresión de la neoplasia. Estas epimutaciones pueden inducir la carcinogénesis colorrectal mediante dos mecanismos, el

primero de ellos sería silenciando los genes supresores de las neoplasias ya sea de forma aislada ya sea de forma conjunta con mutaciones genéticas o deleciones. El segundo sería mediante la activación de oncogenes como consecuencia de la metilación aberrante del promotor o por alteraciones genéticas adquiridas. Los genes supresores de tumores regulan de forma negativa la proliferación celular, por lo que las mutaciones a nivel de estos genes provocan una inactivación de los mismos permitiendo el crecimiento neoplásico. Por el contrario, la mutación de los proto-oncogenes puede dar lugar a oncogenes permitiendo así la proliferación celular por su capacidad carcinogénica. (38)

Los avances en biología molecular en las tres últimas décadas han ayudado a comprender los mecanismos genéticos de la carcinogénesis colorrectal. La mayor parte de los casos son genéticamente esporádicos y sólo un 10-20% tienen un componente familiar. La carcinogénesis esporádica es el resultado de un complejo proceso multifactorial resultante de la alteración del normal ciclo celular de la célula epitelial colorrectal, así pues, la heterogeneidad genética de los tumores colorrectales ha sido muy importante a la hora de desarrollar nuevos métodos diagnósticos moleculares para abarcar las múltiples afectaciones de las vías celulares. El objetivo que se detallará más adelante es intentar aportar una nueva vía en la carcinogénesis colorrectal a través de la vía de SP/NK1-R.

Hay tres mecanismos moleculares principales que causan expresión genética aberrante en la carcinogénesis colorrectal:

- La inestabilidad cromosómica (IC)
- Inestabilidad de microsatélites (IMS)
- Vía serrada y fenotipo metilador de islas CpG (FM)

Estas tres vías principales conducen la transición a lesión patológica y progresión a malignidad las cuales se acompañan de pérdida de la regulación en la expresión genética de los genes supresores y oncogenes (39). Estas alteraciones citogenéticas han sido consideradas como un potencial marcador molecular en la carcinogénesis colorrectal y aportan al clínico junto al diagnóstico histopatológico un potencial factor pronóstico y predictivo en la respuesta al tratamiento (39).

1. En este sentido la IC tiene una prevalencia del 80-85 % de los casos y se caracteriza por inactivación del gen APC/b-catenina relacionado con la adhesión celular y aneuploidía. Los tumores con IC presentan alteraciones del cariotipo, con ganancias y pérdidas cromosómicas, así como translocaciones. Las pérdidas alélicas son relativamente frecuentes, presentando un desequilibrio alélico a nivel de múltiples loci (incluyendo 5q, 8p, 17 p, y 18q). La aneuploidía es la característica de este tipo de tumores. Para su detección se utilizan técnicas como el análisis de la ploidia del ADN, o análisis de la pérdida de

heterocigosidad a nivel de marcadores microsatélites (LOH, *Loss of Heterozygosity*). El factor presumiblemente iniciador de esta vía sería la pérdida de un gen supresor como es el gen APC. De ahí la denominación de vía supresora de carcinogénesis colorrectal, al ser este gen del tipo supresor (relacionado con la regulación negativa del ciclo celular), aunque también se observen, como se ha dicho, ganancias en el número de copias de oncogenes. Las causas para que se produzca la IC son también heterogéneas, habiéndose identificado múltiples candidatos capaces de originarla: genes codificantes de proteínas reguladoras de mitosis (BUBR1)(40); amplificación de AURKA (Aurora Kinasa A), una serina-treonina kinasa asociada al centrómero; APC; TP53; entre otros. Otra de las denominaciones que reciben este tipo de tumores, y que los diferencia de los que se describen en el siguiente apartado, es que éstos son Tumores con Estabilidad de Microsatélites (EMS), para distinguirlos, por tanto, de los que presentan IMS. Se considera que los tumores con IC y aquellos que presentan IMS serían mutuamente excluyentes. En este grupo de CCR (CCR con IC) se encontrarían la mayor parte de los casos de CCR esporádicos (cerca del 85%), pero también aquellos casos de Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) que presentan mutaciones a nivel germinal del gen APC en su base genética. Sin embargo, no hay que olvidar que las divisiones por grupos no son excluyentes; al

contrario, se presentan casos con características comunes de alguno de los diferentes grupos. De este modo, una parte de los casos con fenotipo metilador positivo (60%) también se expresan con EMS. Las características clínicas de este grupo es que se asocian a un peor pronóstico.

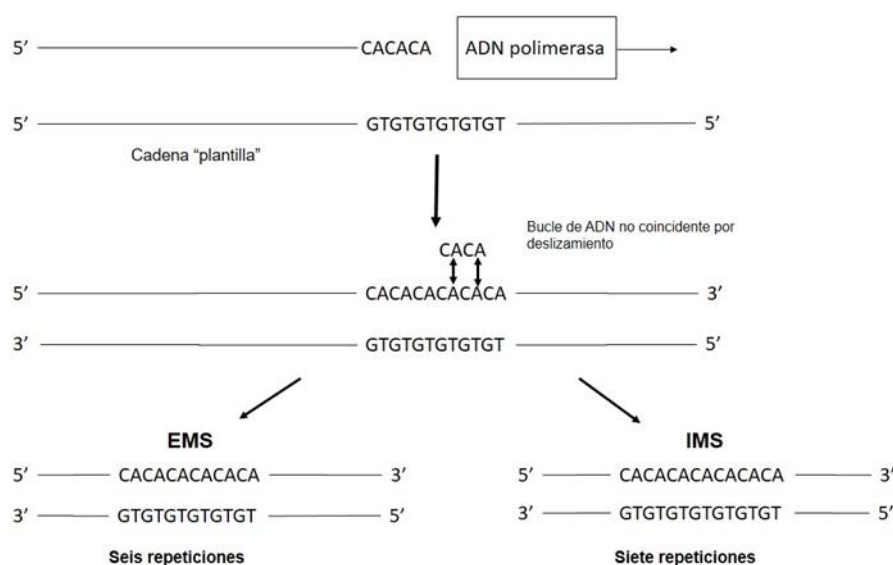


Ilustración 2. Esquematización de la Inestabilidad y Estabilidad de Microsatélites, según el estado del sistema de reparación de errores del ADN.

- En cuanto a la IMS tiene una prevalencia del 10-20 % y se caracteriza por mutaciones/ epimutaciones en los genes del sistema *MMR* (genes reparadores) son genes implicados en la reparación del material genético. La IMS se refiere a las longitudes alteradas de secuencias cortas y repetitivas de nucleótidos (microsatélites) en el ADN tumoral

en comparación con el ADN normal. Términos equivalentes serían fenotipo RER (errores de replicación), o fenotipo mutador y, por tanto, la vía de carcinogénesis correspondiente sería la vía mutadora. En realidad, la IMS es reflejo de la existencia de una alteración del sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN, que está encargado de corregir los fallos que se producen durante la replicación del ADN, y es controlada por varios genes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, entre otros). La alteración de este sistema conduce a la acumulación de alteraciones de los microsatélites, que están distribuidos a lo largo de todo el genoma. Un panel de cinco marcadores nucleótidos es el usado en la mayor parte de los laboratorios para detectar IMS. La definición de IMS está basada en tener igual o más del 30 % de los locus inestables usando marcadores nucleótidos y dinucleótidos. Así pues, tumores con 10-29 % de locus inestables se consideran IMS bajo. La ausencia de expresión de la proteína en el tejido tumoral es indicativa para realizar el test de IMS. Hoy en día los tumores con IMS se refieren a aquellos que presentan IMS alta (2 ó más marcadores de microsatélites según el panel de Bethesda), y está presente en un 15% de los CCR, pudiendo producirse de dos formas diferenciadas. En primer lugar, la que sucede en los casos de síndrome de Lynch, cuya base molecular serían mutaciones a nivel germinal de cualquiera de los genes

relacionados con el sistema de reparación del ADN (41). En segundo lugar, en el que se hallan englobados la mayoría de los casos esporádicos, el mecanismo de la IMS es debido a la hipermetilación a nivel de la región promotora de los genes del sistema de reparación del ADN (con mayor frecuencia a nivel de MLH1). Entre los genes que se ven implicados en la aparición de mutaciones en las secuencias repetidas de mononucleótidos codificantes (microsatélites codificantes) se encuentran distintos genes supresores tumorales, como son el del Receptor para el Factor de Crecimiento Transformador- β tipo 2 (TGFB2), o el gen BAX. La presencia de IMS alta da como consecuencia ciertos rasgos fenotípicos característicos, que no exclusivos, de este tipo de tumores. Así, existe una mayor frecuencia de tumores con diferenciación mucinosa, mayor frecuencia de tumores con células "en anillo de sello", con reacción linfocitaria tipo "Crohn - like", o con presencia de infiltrado linfocitario peritumoral, necrosis tumoral, o mayor frecuencia de tumores pobremente diferenciados, o de localización a nivel del colon derecho. Todos estos datos que el patólogo observa en el estudio histológico sirven para dar valor a la histopatología ya que cuando se refieren en los informes pueden servir para de sospecha para que el Oncólogo en un contexto clínico adecuado indique en estos casos estudio de IMS. Como se verá más adelante, este tipo de tumores también presentan características

propias en relación al pronóstico clínico, o determinada respuesta ante cierto tipo de tratamientos antineoplásicos (41). El hecho de que un CCR presente una, o mejor aún, más características de las citadas como más frecuentes en este tipo de tumores, no hace más que servir de llamada de atención para entonces descartar en especial su asociación con el síndrome de Lynch. Sin embargo, al no ser características exclusivas de los CCR con IMS, previo al estudio genético, se ha de realizar el referido análisis de la IMS, o bien, y más sencillo todavía, el estudio inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas del sistema de reparación del ADN, ausentes cuando hay un defecto de los genes de dicho sistema. Por otro lado, y de la misma forma que sucediera también para algunos casos con IC, en este grupo de tumores existe como dijimos antes a su vez solapamiento con otra de las vías, la vía del FM; siendo aproximadamente un 40% de los tumores los que presentan fenotipo IMS y pueden tener asociada a la vía "serrada" de CCR. Una mutación en alguno de estos genes interfiere en dicha reparación. Una mutación en los genes MMR aumenta la probabilidad de padecer cáncer. Los individuos con mutación en alguno de estos genes pueden desarrollar cáncer a edades precoces. El tipo más frecuente asociado a alteraciones en los genes MMR, es cáncer de colon. En las mujeres, además, se incrementa el riesgo de cáncer de endometrio y ovario. Es importante

recordar que la mayoría de estos cánceres no son hereditarios. De aquellos que son heredados alrededor de la mitad son debidos a mutaciones en el gen hMLH1 y casi un 50% son debidos a mutaciones en el gen hMSH2. El grupo restante es debido a mutaciones en otros genes (hMSH6, PMS2). Otros genes pueden ser responsables de un pequeño grupo de familias con el síndrome de Lynch. Las características clínicas de la IMS son la asociación a tumores de localización proximal y estadios bajos. Aquí el papel del patólogo puede tener su importancia sugiriendo esta posibilidad en los informes de rutina ya que suelen cursar con alto grado de desdiferenciación y abundante infiltración tumoral por linfocitos (41).

3. Por último, en cuanto a la vía serrada y fenotipo metilador (FM) de islas CpG ha venido a completar la clasificación molecular y a ganar en el conocimiento comprensivo de los mecanismos en la carcinogénesis colorrectal. Parece iniciarse en mujeres mediante una mutación que activa el gen BRAF, lo que ocasiona una inhibición de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon. A partir de este suceso, las lesiones serradas pueden dar lugar a pólipos serrados sésiles. Estas lesiones son muy propensas a la metilación de islotes CpG de regiones promotoras de múltiples genes y, por tanto, provocaría un silenciamiento epigenético (inactivación indirecta del gen) de varios genes, siendo en principio aleatorio los genes

específicos que se alteran. En el caso de la metilación del promotor de MLH1, muy frecuente en estos casos, originan los CCR esporádicos con IMS. Parece ser, sin embargo, un evento tardío, pero a partir del cual se produce una rápida adición de mutaciones de otros genes, como sucede también en el síndrome de Lynch, y por tanto, la progresión tumoral más rápida (41).

1.4.4.2.15 Clasificación en base a las vías moleculares

Como se ha señalado previamente, las vías de carcinogénesis en ciertos casos son mutuamente excluyentes (como pueden ser la IMS y la IC), mientras que, en otros, existe cierto solapamiento de las mismas, como sucede con el FM. Hay que señalar en este último supuesto que también se empieza a ver dentro de la vía del FM una división atendiendo al grado de metilación del mismo, clasificándose en FM alto, bajo o cero, según la proporción de promotores de genes metilados igual que sucediera con la IMS, también dividida en IMS alta (en muchas ocasiones considerada propiamente la IMS), baja o EMS. La clasificación del FM también ha surgido al apreciarse diferencias fenotípicas, así como asociación con determinadas alteraciones genéticas, entre los grupos, en especial entre el de FM alto y bajo.

También hay que considerar (de nuevo hablando de solapamiento), que habría una relación proporcional entre el grado de IMS y el del FM, siendo los CCR con

IMS alta esencialmente FM alta, mientras que los CCRs con EMS se relacionarían esencialmente con el grupo FM bajo y cero.

1.4.4.2.16 Clasificación molecular (CMS)

Se trata de una clasificación consensuada basada en los subtipos moleculares (*consensus molecular subtypes* –CMSs) (42). El CCR es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista biológico. Existían varias clasificaciones del CCR desde el punto de vista molecular y se ha intentado unificarlas para facilitar la investigación traslacional y se ha formado un consorcio internacional que integra a los grupos más importantes que han compartido sus casos (4.562 casos), sus análisis biológicos y sus clasificaciones previas (seis diferentes clasificaciones previas) generando una única clasificación de consenso de subtipos moleculares.

- CMS1 (14% de los CCR): se denomina **tipo inmune**. Se asocia a IMS y a una importante activación inmunológica. Es el grupo que responde a inmunomoduladores (*check point inhibitors*). Se asocia a hipermutación, hipermetilación y a mutaciones en BRAF. Se asocia a mayor frecuencia de mujeres, ancianos y colon derecho. En enfermedad resecable tienen mejor pronóstico, pero en enfermedad avanzada se asocian a peor pronóstico.
- CMS2 (37% de los CCR): **tipo epitelial**. Expresa activación de WNT y MYC. Tienen un número alto de alteraciones en el número de copias

somáticas (*somatic copy number alterations* –SCNA-) y se asocia a mutaciones en p53. Se asocia a colon izquierdo.

- CMS3 (13% de los CCR): **tipo metabólico**. Tiene características epiteliales, pero con importante disregulación metabólica. Tienen un número bajo de alteraciones en el número de copias somáticas (SCNA). Se asocia a sobreexpresión de IGFBP2 y a mutaciones en KRAS.
- CMS4 (23% de los CCR): **tipo mesenquimal**. Presentan activación de TGFB (*transforming growth factor B*), invasión estromal y angiogénesis. Más frecuente en jóvenes y estadios III y IV. Implican un peor pronóstico tanto en enfermedad resecada como en enfermedad avanzada.
- CMS **no clasificables** (13% de los CCR) presentan características intermedias y podrían deberse a fenotipos en transición o a heterogeneidad intratumoral.

Por último, la nueva clasificación molecular en cáncer de colon se basa en el origen izquierdo o derecho del tumor así un 70% de los tumores aparecen en el colon izquierdo y solo un 30% aparecen en el colon derecho.

Esta clasificación del CCR es actualmente la más robusta desde el punto de vista biológico y debería ser la base para una futura clasificación clínica y para el desarrollo de tratamientos específicos para los distintos subtipos.

Según los últimos datos publicados por la SEOM el cáncer de colon continúa siendo, con más de 34.000 casos nuevos diagnosticados cada año, el tumor con mayor incidencia entre la población española si juntamos ambos sexos. Pero, si bien se habla siempre de este tumor como una entidad única, la realidad es que existen múltiples diferencias entre el cáncer de colon izquierdo y el cáncer de colon derecho.

De hecho, precisamente estas diferencias, muy bien documentadas en las historias clínicas acumuladas por los profesionales sanitarios, son las que han permitido crear una nueva clasificación molecular del CCR que será la nueva forma de tratar los tumores de colon en el futuro. Esta clasificación molecular será posible porque se ha comprobado que, al comparar los datos moleculares con los datos de localización, los resultados apuntan a que los subtipos 2 se localizan en el colon izquierdo y los subtipos 1 en el colon derecho. Así, son las características biológicas distintivas entre cáncer de colon izquierdo y cáncer de colon derecho las que van a permitir que los profesionales sanitarios puedan tratar en un futuro a los pacientes con CCR según su caracterización molecular más que por su localización anatómica.

Diferencias entre el cáncer de colon derecho e izquierdo, además de una prevalencia diferente (un 70% de los tumores se originan en el colon izquierdo y un 30% en el colon derecho), los síntomas de los pacientes también pueden variar según la localización del cáncer. Así, mientras que los pacientes con cáncer de colon izquierdo suelen sufrir desde el principio rectorragias o sangrado

anal, y dolores tipo cólico que advierten de la presencia de la enfermedad, los pacientes con cáncer de colon derecho no sufren estos síntomas hasta que el tumor no está en un estadio mucho más avanzado. El aspecto de la lesión preneoplásica varía bastante en función de la ubicación en el lado izquierdo o derecho del tumor. Así, los pólipos que aparecen en el colon derecho suelen ser planos y su detección es mucho más complicada que la de los pólipos que aparecen en el colon izquierdo, que tienen un aspecto más típico y prominente hacia la luz intestinal. De hecho, estas dificultades diagnósticas provocan que el cáncer de colon derecho se detecte normalmente más tarde que el cáncer de colon izquierdo.(42)

Unos datos que no se traducen en una mayor mortalidad en cáncer de colon derecho, ya que cuando el tumor se detecta precozmente, sin que hayan aparecido metástasis, el tratamiento probablemente tenga un impacto parecido en ambas localizaciones.

Estas clasificaciones de los CCR según las diferentes vías moleculares, así como la identificación de las distintas alteraciones tendrían escaso valor si sólo se aplicaran para la categorización o el conocimiento. Las bases moleculares y alteraciones genéticas dan como consecuencia un fenotipo concreto, que en muchas ocasiones viene acompañado de diferentes comportamientos de los tumores, bien sea desde un punto de vista pronóstico (mayor o menor supervivencia), o bien por identificar diferente grado de respuesta ante ciertos tratamientos, etc. (43).

Así pues, se están acumulando evidencias de que el status de la IMS puede ser un útil marcador pronóstico y predictivo en CCR esporádico. La IMS se asocia con un incremento en la supervivencia del paciente y un pronóstico favorable. En un meta-análisis con 607 individuos diagnosticados de CCR los pacientes con IMS tenían un pronóstico más favorable, con menor número de metástasis ganglionares y sistémicas. Sin embargo, el uso de IMS como marcador pronóstico en la clínica, aunque controvertido algunos estudios han reportado que la probable asociación entre la IMS y el desarrollo metacrónico. Según algunos estudios, la presencia de IMS parece estar asociada al desarrollo de CCR metacrónico, pero la hipótesis no está exenta de controversia en el momento actual y con ella el uso de la IMS como marcador pronóstico. Se acumulan además evidencias que soportan que la IMS puede ser un factor predictivo de la respuesta a la quimioterapia adyuvante. Parecen existir evidencias de que pacientes con IMS no se benefician de las terapias con 5-FU comparado con pacientes con tumores con estabilidad de microsatélites. El valor de uso de IMS como marcador predictivo de quimio sensibilidad es aún discutido. La IMS alta se ha asociado a su vez con un mejor pronóstico en los CCR que la presentan, especialmente en estadios II del CCR.

El desarrollo más importante de los últimos años en el tratamiento del CCR metastático ha sido la identificación del estado de mutación a nivel del gen K-Ras, como factor predictivo de la respuesta o no a terapias específicas frente al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). (44) Cerca de un

40% de los pacientes con CCR metastático presentan una mutación somática de K-Ras, siendo esto un signo de la ausencia de respuesta a los inhibidores de EGFR, como el cetuximab o panitumumab, haciendo hoy en día imprescindible el análisis de mutaciones en dicho gen antes de iniciar la terapia en este tipo de pacientes. Además, estudios recientes han reportado evidencias que las mutaciones dobles en K-Ras y en N-Ras predicen una no respuesta a las terapias anti-EGFR. Estos estudios avalan el estudio completo del RAS (K-Ras y N-Ras) como marcadores predictivos negativos para la terapia con anti-EGFR. De igual forma, se ha visto que en el 60% restante, con K-Ras nativo o no mutado, aproximadamente el 60-70 % de tienen una respuesta limitada a la terapia anti EGFR, lo que sugiere que mutaciones adicionales pueden contribuir a la respuesta anti- EGFR. La SEOM tiene una guía recomendando el estado mutacional del Ras en pacientes candidatos a las terapias anti-EGFR lo que significa un paso adelante en el futuro de la medicina personalizada contra el CCR (42).

Existen otras alteraciones moleculares que podrían determinar de nuevo una falta de respuesta a los anticuerpos monoclonales frente a EGFR. Es el caso concreto del gen BRAF. Este gen se altera en el 8-10% de los CCR metastáticos, siendo excluyente su mutación de la presentada en K-Ras , y se ha visto un peor pronóstico, asociado a los intervalos total y libre de enfermedad, en pacientes tratados con los anticuerpos mencionados y la presencia de mutaciones en BRAF , aunque aún se ha de investigar en mayor profundidad para confirmar la

asociación de las mutaciones en dicho gen con la resistencia al tratamiento con anticuerpo monoclonales frente a EGFR se ha propuesto el uso de del test del estatus de BRAF en los casos de pacientes con K-Ras nativo (no mutado).

Otros estudios se hallan en curso con el objeto de valorar otros marcadores como posibles factores pronósticos o de respuesta al tratamiento, como puede ser la pérdida de heterocigosidad a nivel del brazo largo del cromosoma 18, la timidilato sintetasa, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), o diversas interleucinas. Además, se están implementando estudios tanto de expresión de RNA como de microRNAs, candidatos a mejorar la comprensión de las vías moleculares mediante el hallazgo de transcripciones expresadas, éstas pueden usarse para identificar señales relevantes así pues la expresión de dos secuencias a nivel de EST y SAGE son dos candidatos prometedores como biomarcadores tumorales de futuro. En cuanto a los miRNAs han demostrado un total de 362 diferencias de expresión en el tejido tumoral y el normal (242 up y 120 down regulaciones) siendo necesarios nuevos estudios clínicos para valorar su utilidad en el diagnóstico, pronóstico y posibilidades terapéuticas.

Por último, en cuanto a la vía EGFR distintos estudios se han focalizado en encontrar biomarcadores adicionales que ayuden a predecir la respuesta al tratamiento con anti-EGFR en pacientes con KRAS no mutado (el 70 % no responden a terapias anti-EGFR). Así pues dos ligandos anfiregulina y epiregulina han sido asociados a mejor repuesta a la terapia siendo candidatos

a ser marcadores predictivos junto a los dos genes (DUPS6 y SLC26A3) que conforman un panel en el que se ha demostrado una respuesta predictiva en paciente con KRAS de tipo nativo (42).

La señal EGFR dispara dos cascadas intracelulares RAS y BRAF conduciendo la activación de kinasas, que fosforilan a KT1 que a su vez interacciona entre PIK3CA y PTEN. Mutaciones en éstas dos últimas también se han investigado como marcadores anti- EGFR. Parece ser que la mutación PIK3CA afecta independientemente a la respuesta a anti-EGFR estando presente en el 20 % de los CCR. Así pues, se ha propuesto la detección combinada con la mutación en RAS antes de iniciar las terapias anti-EGFR. Además, se ha documentado que la mutación en PIK3CA tiene un peor curso clínico en términos de supervivencia libre de enfermedad. La pérdida de expresión de PTEN ocurre aproximadamente en el 30 % de los CCR esporádicos y se ha asociado a falta de respuesta a anti EGFR y peor supervivencia en pacientes con metástasis.

Por último , los puntos de control en la vía PD-1 utilizando fármacos anti PD1/PD-L1 son una de las vías más prometedoras en el tratamiento con inmunoterapia en pacientes con IMS+ en cáncer metastásico refractario a tratamiento (42).

1.4.4.2.16.1 Otros factores clínicos del paciente

Distintos trabajos han intentado analizar el papel de los parámetros iniciales de los pacientes con CCR en el pronóstico. Es conocido por todos que los pacientes dentro de un mismo estadio patológico pueden tener comportamientos distintos que pueden deberse a variables clínicas específicas de cada paciente. La edad y el sexo son variables a estudiar en relación con el CCR.

La influencia de la raza y del índice de masa corporal (IMC) en el pronóstico de los pacientes con CCR solo ha sido relacionado con la supervivencia.

La anemia en los pacientes con CCR aparece durante un 30-67 % de las veces en el transcurso de la enfermedad. Los mecanismos que contribuyen a la aparición de este signo son múltiples destacando la pérdida de sangre por el sangrado del propio tumor y/o la disminución de la absorción y utilización del hierro. La anemia se ha relacionado con resultados negativos en pacientes con CCR debido al mecanismo de hipoxia tumoral. La hipoxia ha sido relacionada con la resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia; además de inducir cambios proteómicos y genómicos, la hipoxia también puede aumentar el potencial proliferativo y metastásico. Teniendo en cuenta que la cirugía como tratamiento inicial en la mayoría de pacientes con cáncer de colon puede intensificar la anemia durante el postoperatorio inmediato, la mayoría de grupos

se centran en el estudio de la anemia preoperatoria como factor pronóstico. Se ha publicado recientemente un metaanálisis que concluye que la anemia preoperatoria tiene un impacto negativo en la supervivencia global y en la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con cáncer de recto, pero no en el cáncer de colon (45)

Varios estudios realizados en pacientes sometidos a cirugía por CCR han relacionado la anemia preoperatoria con peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades metabólicas más comunes. El aumento de la incidencia de esta patología junto con el incremento a nivel mundial de la incidencia de cáncer ha motivado la investigación de la influencia que puede tener la diabetes mellitus en el desarrollo y evolución de pacientes con cáncer. La resistencia a la insulina o hiperinsulinemia compensatoria ocasiona alteraciones hormonales y metabólicas, y participa en la formación de un microambiente para la tumorigénesis y progresión tumoral. Sin embargo, no está claro si los pacientes con CCR y DM tienen un peor pronóstico respecto a los pacientes sin DM. En 2013 se publicó un meta-análisis que atribuía a la DM una influencia negativa en el pronóstico de pacientes con CCR, pero desde entonces los resultados descritos al estudiar series de pacientes con CCR a largo plazo no han permitido establecer de forma precisa la relación entre la DM y el CCR. Recientemente se ha publicado un metaanálisis que concluye que la DM ejerce un efecto negativo en la supervivencia de los

pacientes con CCR, pero se necesitan más estudios para confirmar esta relación (46).

La existencia de complicaciones postoperatorias como son por ejemplo la existencia de fuga anastomótica se ha relacionado con la SGEC de forma independiente al estadio histopatológico e influye de forma negativa en la supervivencia específica por cáncer de los pacientes con CCR. La fuga anastomótica podría favorecer la implantación de las células tumorales alejadas de la neoplasia. Se ha constatado además que en estos pacientes con complicaciones postquirúrgicas existe un incremento de la inflamación y de la angiogénesis y que podría ser este el mecanismo responsable de la alta tasa de recidivas identificadas en éste grupo de pacientes (47).

1.4.4.2.16.2 Nuevos factores pronósticos

En los últimos años, las tasas de mortalidad han disminuido significativamente debido a la mejora en las terapias combinadas de quimioterapia adyuvante y a las técnicas quirúrgicas en el manejo de esta patología por equipos multidisciplinarios, todo esto unido al aumento del diagnóstico precoz gracias al desarrollo de los programas de screening. El CCR es una entidad heterogénea, y los modelos predictivos de estadificación como el sistema TNM no son del todo completos para orientar un manejo terapéutico adecuado; esto se demuestra por el hecho de que existen variaciones en la supervivencia en pacientes dentro del mismo estadio. Así pues, se han

identificado muchos parámetros clínico-patológicos y moleculares evolutivos en pacientes con CCR que suponen un incremento considerable en el gasto con el uso de estas técnicas. Existe un interés creciente en identificar nuevos marcadores que nos ayuden a estratificar a los pacientes con CCR de una forma más específica de cara a un mejor enfoque terapéutico, nos hemos centrado en el estudio de dos circunstancias que creemos que pueden influir en el pronóstico de pacientes con CCR. El estado inmunitario preoperatorio de los pacientes con CCR se puede estimar mediante parámetros inflamatorios preoperatorios.

Índices inflamatorios preoperatorios: en las últimas décadas se ha descrito una importante relación entre la respuesta inflamatoria y la patogénesis de diversos tipos de neoplasias. La primera descripción fue realizada por Virchow en 1863, y posteriormente muchos estudios han demostrado que el estado inflamatorio característico de pacientes con tumores se correlaciona con el desarrollo del tumor y con su progresión. Los marcadores en sangre periférica son el reflejo de la respuesta inflamatoria que ocurre tanto a nivel local como sistémico en pacientes con cáncer.

La elevación de citoquinas, factores de crecimiento, proteasas y otros mediadores inflamatorios inhiben la apoptosis tumoral, promueven la angiogénesis y dañarían el ADN (48). El vínculo entre la inflamación crónica y la susceptibilidad al desarrollo de CCR ha sido demostrado en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Crónica Intestinal en los que el riesgo de CCR aumenta entre 0.5-1% cada año. Además, se ha demostrado que algunos fármacos

antiinflamatorios, como los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y los esteroides, pueden reducir la incidencia y la progresión, así como la mortalidad, del paciente con CCR. Debido a esto, en los últimos años existe un gran interés en estudiar el papel pronóstico de diversos biomarcadores inflamatorios en sangre periférica en pacientes con CCR. La Proteína C reactiva (PCR) es el principal componente de cualquier reacción inflamatoria. También se han investigado el papel de varias citoquinas, como interleucinas y el tumor necrosis factor Alpha (TNF- α), el problema de estos marcadores es su falta de disponibilidad en la mayoría de los laboratorios y su alto coste. Ciertas alteraciones en sangre periférica, como la linfopenia, neutrofilia y trombocitosis, se han asociado clásicamente con la inflamación sistémica y el desarrollo y progresión de células tumorales. La combinación de estos parámetros, ha sido investigada en los últimos años, describiendo nuevos biomarcadores pronóstico en sangre periférica más disponibles y económicos:

Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR)

Los neutrófilos son un componente importante de la sangre periférica, y se ha demostrado que promueven el desarrollo de tumores, debido a su efecto en la angiogénesis relacionada con el tumor. El NLR, definido como el recuento absoluto de neutrófilos dividido por el recuento de linfocitos, es un marcador efectivo de inflamación que se está usando cada vez más para evaluar resultados en pacientes quirúrgicos, una elevación de este índice implica un peor pronóstico en pacientes con CCR. Además de esto, son una fuente primaria de

citocinas reguladoras de la angiogénesis. Los linfocitos, a su vez, poseen potentes propiedades antitumorales, y juegan un papel importante en la inmunidad contra el cáncer. Una disminución en el recuento de linfocitos se ha correlacionado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (49). Sin embargo, el valor de corte específico del NLR y su impacto en la supervivencia a largo plazo aún no ha sido descrito.

Platelet-lymphocyte ratio (PLR)

En varios estudios han observado que un elevado número de plaquetas preoperatorias se relaciona con un pronóstico negativo en pacientes con CCR. El PLR se obtiene al dividir el número total de plaquetas en valor absoluto entre el número de linfocitos. En dos meta-análisis recientes la elevación de este marcador se ha asociado a un pronóstico negativo en pacientes con CCR(50)

Lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR)

Estudios recientes han demostrado que el aumento de este índice se relaciona con una mejor supervivencia en pacientes con CCR; incluso se ha atribuido a este marcador un mayor valor predictivo. El marcador se obtiene al dividir el valor absoluto de linfocitos en sangre periférica entre el número de monocitos. El componente linfocítico de este marcador ha sido descrito en estudios de los años setenta, en los que se objetivó linfopenia en pacientes con CCR. El papel de los monocitos en el pronóstico de pacientes con CCR ha sido evaluado recientemente; la circulación de monocitos puede contribuir tanto al

crecimiento del tumor como a disminuir la inmunidad celular. Por otra parte, los monocitos séricos se diferencian en macrófagos dentro del tumor después de la infiltración. Hay evidencia creciente de que los macrófagos asociados a células tumorales ejercen una actividad que es principalmente protumoral incluyendo el desarrollo de metástasis, inmunosupresión y angiogénesis tumoral. Por lo tanto, los niveles séricos elevados de monocitos en circulación pueden reflejar un aumento en los niveles de macrófagos asociados a células tumores y un peor pronóstico. El recuento de células supresoras derivadas mieloides también puede reflejar el aumento del recuento de monocitos, y este aumento representa un estado de inmunosupresión que conduce a una reducción de la inmunidad tumoral y confiere un peor pronóstico. Las células supresoras derivadas mieloides son un subconjunto de leucocitos circulantes que tienen actividad inmunosupresora.

Algunos de los parámetros descritos son independientes de los de estadio. Los factores de estadio sirven para analizar la extensión del CCR.

El CCR posee varios **patrones de crecimiento**, que pueden ocurrir al mismo tiempo y no son excluyentes entre sí debido a la heterogeneidad neoplásica. La secuencia habitual es que en primer lugar la extensión local, después la infiltración linfática y, por último, la diseminación hematológica. La “siembra” peritoneal por células cancerígenas es otra manera de progresión del tumor(51).

- Extensión local: El cáncer puede crecer en todas las direcciones: hacia el interior o el exterior del colon o recto, hacia arriba o abajo. Puede estrechar o, incluso, cerrar la luz intestinal provocando una obstrucción o una perforación.
- Infiltración linfática: Los ganglios linfáticos están distribuidos por todo el organismo, y que sirven como barrera contra las infecciones. Los ganglios se agrupan en “cadenas ganglionares”. Las células cancerígenas tienen capacidad para emigrar desde donde se han originado (tumor primario) y desplazarse a través de los vasos linfáticos hasta llegar a los ganglios.
- Diseminación hematológica: Cuando las células cancerígenas alcanzan el torrente sanguíneo, alcanzan la capacidad de desplazarse para depositarse como nuevos focos tumorales en otros órganos. Son las “metástasis a distancia”, es decir, a distancia del sitio donde se ha originado el cáncer. Por ejemplo, las metástasis (= ramificaciones) en el pulmón o en el hueso se producen por diseminación hematológica. El CCR se disemina por vía hematológica principalmente al hígado, a los pulmones, a los huesos y a otros órganos (por este orden de frecuencia).
- Siembra peritoneal: Las células cancerígenas pueden soltarse del tumor del colon y depositarse en la superficie de otros órganos o

estructuras abdominales y pélvicas, como el intestino delgado o los ovarios, produciendo nuevos focos tumorales.

Los parámetros de estadio son los de mayor significación pronóstica, comportándose como variables estadísticamente independientes.

1.4.4.2.17 Grupos de estadio en el carcinoma colorrectal (51)

- Estadio 0: se denomina carcinoma “in situ”. Las células cancerosas se encuentran solo en la mucosa, o revestimiento interno, del colon o el recto.
- Estadio I: el cáncer ha crecido, atravesado la mucosa e invadido la capa muscular del colon o el recto. No se ha diseminado a los tejidos cercanos o ganglios linfáticos (T1 o T2, N0, M0).
- Estadio IIA: el cáncer ha crecido y atravesado la pared del colon o del recto, pero no se ha diseminado a los tejidos o ganglios linfáticos cercanos (T3, N0, M0).
- Estadio IIB: el cáncer ha crecido a través de las capas musculares hasta llegar al revestimiento del abdomen, denominado peritoneo visceral. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte (T4a, N0, M0).
- Estadio IIC: el tumor se ha diseminado a través de la pared del colon o del recto y ha invadido estructuras cercanas. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte (T4b, N0, M0).

- Estadio IIIA: el cáncer ha crecido a través del revestimiento interno o en las capas musculares del intestino. Este se ha diseminado hacia 1 a 3 ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos, pero no se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo (T1 o T2; N1 o N1c, M0 o T1, N2a, M0).
- Estadio IIIB: el cáncer ha crecido a través de la pared intestinal o en los órganos circundantes y en 1 a 3 ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos. No se ha diseminado a otras partes del cuerpo (T3 o T4a, N1 o N1c, M0; T2 o T3, N2a, M0; o T1 o T2, N2b, M0).
- Estadio IIIC: independientemente de la profundidad con que se extendió el cáncer de colon, se ha diseminado a 4 o más ganglios linfáticos, pero no a otras partes distantes del cuerpo (T4a, N2a, M0; T3 o T4a, N2b, M0; o T4b, N1 o N2, M0).
- Estadio IVA: el cáncer se ha diseminado a una sola parte distante del cuerpo, como el hígado o los pulmones (cualquier T, cualquier N, M1a).

Los parámetros de estadio y de grado se correlacionan con la recidiva neoplásica. Los de grado, fundamentalmente con la recidiva local, y los de estadio (especialmente la invasión linfoganglionar y vascular) con las metástasis a distancia.

1.4.4.2.18 Clasificación de Dukes

La clasificación de Dukes, introducida en St. Mark's Hospital en 1928, con alguna matización, estratifica los casos en cuatro grupos:

- A: CCR localizado en la pared del intestino grueso, sin sobrepasarla y sin metástasis linfoganglionares.
- B: Infiltración más allá de la pared intestinal, sin metástasis linfoganglionares. Por la trascendente repercusión pronóstica y por la posibilidad de intervención quirúrgica añadida (*second look*) se pueden considerar dos subestadios en el B, como son B1, cuando los órganos vecinos están libres, y B2 cuando hay infiltración de órganos vecinos (52).
- C: CCR en el que hay invasión de ganglios linfáticos, con independencia de la extensión intraparietal. Este grupo lo subdividimos en dos categorías, siguiendo la estratificación introducida por el *GastroIntestinal Tumour Study Group*, de C1, cuando hay de 1 a 4 ganglios linfáticos invadidos, y C2, cuando hay más de 4 ganglios metastatizados, ya que tiene también una notable trascendencia sobre el pronóstico, que experimenta una depresión de más del 50% en en la segunda situación.
- D: CCR con metástasis en órganos a distancia. Habitualmente este estadio no es competencia del patólogo, ya que éste precisa muestras

de las metástasis para su confirmación microscópica, cosa que no suele ocurrir con frecuencia.

Así estratificados los casos, la supervivencia a los 5 años de los mismos se resume en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación modificada de Aster-coller (MAC).

Estadio	Nº casos (%)	Supervivencia a 5 años (%)
A	11,4	88,9
B	53,0	62,5
B1	43,2	75,3
B2	9,8	18,2
C	24,0	37,0
C1	18,5	43,0
C2	5,5	15,0
D	1,6	1,9

La otra clasificación es la clasificación modificada de Aster-Coller (MAC) (A, B, C, D), que también tiene en cuenta el grado de afectación de la pared intestinal, la presencia de metástasis en los ganglios regionales y las metástasis a distancia.

- Estadio I o A: afectación de submucosa.
- Estadio II o B: afectación de capa muscular, grasa perivisceral o de órganos vecinos.
- Estadio III o C: ganglios positivos

- Estadio IV o D: metástasis a distancia (hígado, pulmón)

La supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal se relaciona con estos estadios, siendo > 95% en el estadio 0 y va descendiendo a medida que aumenta el estadio. El estadio IV o D es el de menor supervivencia, aunque cada vez más pacientes con estadio IV se pueden curar con abordajes multidisciplinares (participación de diferentes especialistas y tratamientos) (53).

1.4.4.2.19 Sistema de estadios de la UICC

Se trata de la clasificación más utilizada en la práctica diaria. Incluye cambios en la octava edición (2017) que es la que actualmente está en vigor (13).

Tumor primario (T):

- Tx: se desconocen las características del tumor primario.
- T0: no hay evidencia de tumor primario.
- Tis: carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (extensión a lámina propia sin superar la muscularis mucosae).
- T1: invasión submucosa (a través de la muscularis mucosae sin alcanzar la muscular propia).
- T2: invasión de muscular propia.
- T3: invasión a través de la muscular propia en tejidos pericorrectales.
- T4: el tumor perfora el peritoneo visceral o invade o se adhiere a órganos o estructuras adyacentes.

- T4a: el tumor invade a través del peritoneo visceral (incluyendo perforación macroscópica del colon a través del tumor e invasión continua del tumor a través de áreas de inflamación a la superficie del peritoneo visceral).
- T4b: el tumor infiltra directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras.

Ganglios linfáticos regionales (N):

- Nx: ganglios linfáticos regionales no pueden asegurarse
- N0: No hay metástasis regionales.
- N1: Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos pericolónicos o perirrectales (el tumor en los ganglios es mayor o igual a 2 mm) o cualquier número de depósitos tumorales están presentes y todos los ganglios linfáticos son negativos.
 - N1a: Metástasis en un ganglio regional.
 - N1b: Metástasis en 2-3 ganglios regionales.
 - N1c: No hay metástasis linfoganglionares regionales, pero si depósitos tumorales (satélites) en la subserosa, mesenterio o en tejidos blandos perirrectal o pericolónicos no peritonealizados o tejidos perirrectal / mesorrectales.
 - N2: Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos pericolónicos o perirrectales.

- N2a: Metástasis en 4 a 6.
- N2b: Metástasis en siete o más ganglios linfáticos regionales.

Metástasis a distancia (M):

- M1: Metástasis a uno o más sitios a distancia o órganos o metástasis peritoneales.
 - M1a: Metástasis confinada a un sitio u órgano sin metástasis peritoneales.
 - M1b: Metástasis en dos o más sitios u órganos sin metástasis peritoneales.
 - M1c: Metástasis en la superficie peritoneal sola o con metástasis en otro sitio u órgano.

1.4.4.3 Relación entre grado de malignidad, estadio y pronóstico

Los cánceres se clasifican por etapas o estadios. Este tipo de clasificación permite agrupar a los pacientes con cánceres en los mismos estadios, porque tienen un pronóstico similar y se les aplican tratamientos similares.

La clasificación más empleada es el TNM que está compuesta por tres parámetros: la “T” que hace referencia al nivel de infiltración parietal, la “N” (Nodes en inglés) que se refiere a los ganglios locorreionales, y la “M” a las metástasis a distancia. En función del T, N y M se definen los estadios.

- Estadio 0 ó carcinoma in situ: Es la etapa más inicial del cáncer. Se localiza en la parte más superficial de la mucosa y no infiltra las otras capas del colon o recto, no invade los ganglios regionales ni produce metástasis a distancia.
- Estadio I: Después del estadio 0, es el más favorable (=mejor pronóstico) (14).
- Estadio II y Estadio III: Son etapas intermedias. En general, el estadio II tiene mejor pronóstico que el III, porque en el estadio II no existe afectación ganglionar y en el estadio III sí. Estos estadios a su vez se subclasifican en IIa y IIb, y en IIIa, IIIb y IIIc.
- Estadio IV: Es la etapa más avanzada. Su pronóstico es el peor porque existen metástasis a distancia.

1.5 TRATAMIENTO DE CCR

En la elección del/los tratamientos(s) más adecuado(s) para un paciente, se tienen en cuenta:

- Factores dependientes del **paciente**: edad, estado general, situación nutricional, comorbilidades y por supuesto, la voluntad y decisión del propio paciente.

- Factores dependientes del **tumor**: zona del colon o recto donde está el cáncer, fase de desarrollo (=estadio), estado de RAS en los CCRs metastáticos, tipo de tumor (adenocarcinoma, linfoma, etc.).
- Factores dependientes del tratamiento: tipo de **cirugía**, tolerancia y eficacia de la quimioterapia, estado mutacional de RAS para los anticuerpos monoclonales anti-EGFR, o de la radioterapia.

Los tres tipos principales de tratamiento del CCR son la cirugía, la quimioterapia (incluyendo los anticuerpos monoclonales y un inhibidor tirosina quinasa) y la radioterapia, aunque, en algunos pacientes, el tratamiento será exclusivamente sintomático (por ejemplo: analgésicos si hay dolor) o endoscópico (resección de pólipos o colocación de prótesis) (54).

En muchas ocasiones, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia se combinan, pero otras veces solo está indicado uno de ellos. Es decir, para aumentar las posibilidades de curación, el tratamiento requiere un “enfoque multidisciplinar” o, lo que es lo mismo, un tratamiento múltiple en el que intervienen médicos de varias especialidades: cirujanos, oncólogos médicos, oncólogos radioterápicos.

La cirugía es un tratamiento en el que los cirujanos realizan una serie de actuaciones dirigidas a la extirpación de los tejidos enfermos, la solución de problemas de obstrucción, el recambio de estructuras dañadas, lavados, drenajes de abscesos, colocación de prótesis, etc.

Desde el punto de vista de la resecabilidad (=posibilidad de extirpar completamente el tumor), los cánceres se clasifican en:

- tumores locales (que se pueden extirpar)
- tumores extendidos a nivel loco-regional (el cáncer está extendido a las estructuras vecinas y, por eso, en algunos casos no se puede resecar)
- con metástasis a distancia (el cáncer está extendido a órganos como el hígado o el pulmón). Algunas veces las metástasis hepáticas o pulmonares se pueden extirpar, y pero muchas otras no. Depende del número de metástasis, el tamaño, la localización, etc.

El tratamiento quirúrgico de cualquier cáncer puede tener dos “intenciones”:

- Intención curativa: la cirugía se realiza para intentar eliminar todo el cáncer.
- Intención paliativa: la cirugía se realiza para intentar mejorar los síntomas que produce el tumor (por ejemplo: la obstrucción intestinal), pero no se puede extirpar toda la enfermedad porque ya está muy extendida.

La cirugía se realiza sobre el tumor primario, y en algunos casos, también se resecan las metástasis hepáticas y/o pulmonares. La resección del tumor primario incluye la extirpación completa de la zona del colon donde asienta el

tumor y los ganglios peri regionales La técnica depende de la localización del tumor.

El único tratamiento con capacidad curativa en el CCR es la cirugía, teniendo en cuenta algunas directrices que han sido ampliamente estudiadas.

La resección del tumor debe hacerse con adecuados márgenes, más de 5 cm y con linfadenectomía que incluya más de 12 ganglios, para que permita un estudio anatomopatológico completo y adecuado.

Ante un tumor con invasión de los órganos adyacentes (T4) deberá realizarse una resección en bloque para obtener una resección macroscópica completa (R0). La técnica quirúrgica, dependerá de la localización del tumor.

En el tumor de colon derecho, se deberá realizar una hemicolectomía derecha con movilización del ángulo hepático, ligadura de vasos ileocólicos y arterias vasos cólicos. La anastomosis ileotransversa puede ser manual ó mecánica.

En el tumor de localización izquierda, se realizará una hemicolectomía izquierda con movilización de la flexura esplénica, ligadura de vasos cólicos izquierdos (mesentéricos izquierdos), y anastomosis mecánica o manual. Se actuará de igual forma en los tumores sigmoideos, pero respetando la cólica izquierda.

En los tumores de la unión rectosigmoidea (objeto del presente estudio), se realizará una Resección anterior baja (RAB), y se aconseja realizar una

ileostomía de protección transitoria. La técnica en las neoplasias rectales, incluye la escisión total del mesorrecto (ETM) y linfadenectomía completa inferior, ya que la afectación circunferencial del mesorrecto modifica el índice de recidiva y el de supervivencia. La ETM ha condicionado un descenso de las recidivas locales desde un 58% a un 30%. El margen oncológico distal en el recto, se acepta que sea de 2 cm, con lo que se consigue en la mayoría de los casos la preservación esfinteriana. A pesar de esto, existen ocasiones en que la proximidad del tumor al margen anal, obliga a realizar amputación abdominoperineal (intervención de Miles) con colostomía definitiva. El abordaje laparoscópico tiene resultados similares a la cirugía convencional tanto en morbilidad como en supervivencia, igual que la cirugía robótica, mejorando el dolor y el ileo postoperatorio, así como la estancia postoperatoria. Es útil, ya que parece existir mejor recuperación de los pacientes, la preparación mediante *Fasttrack* y ERES (*enhanced recovery after surgery*, o Rehabilitación multimodal). En pacientes con tumores rectales estadio T1N0M0 que tienen una afectación de menos del 40% de la circunferencia rectal, un tamaño inferior a 4 cm, y están situados a menos de 10 cm del margen anal, bien o moderadamente diferenciados, y sin invasión vascular o linfática, la resección transanal (TAMIS) es una alternativa válida que se está desarrollando ampliamente en la actualidad.

Se debe realizar una consideración especial sobre el tratamiento quirúrgico en los pacientes con formas hereditarias de CCR. Actualmente, no existen datos para ofrecer colectomías profilácticas a pacientes afectos de

Síndrome de Lynch, de alto riesgo o con mutación de genes responsables. También, se debería ofrecer una histerectomía y doble anexectomía a las mujeres afectas que ya hayan completado su deseo reproductivo, por la mayor incidencia en estas de cáncer de endometrio y ovario. De igual forma, debería ser considerada en aquellos pacientes que no vayan a adherirse a medidas de cribado anual endoscópico, ya que estos pacientes tienen mayor riesgo de presentar tumores metacrónicos y una progresión más rápida desde el adenoma.

El Tratamiento postquirúrgico o adyuvante de las neoplasias de colon (55), depende del Estadio clínico que hemos referido con anterioridad siendo las normas generales las siguientes :

- En los Estadios 0 y I, la lesión está limitada a la mucosa y muscular y, por tanto, no es necesario tratamiento adyuvante.
- En Estadios II (T3 T4 N0 M0), se aconseja el tratamiento con quimioterapia (QT), cuando el tumor tenga factores de riesgo de mal pronóstico: Grado de diferenciación G3 o G4 (indiferenciados), Tumor T4, invasión de órganos adyacentes y/o invasión peritoneal. Invasión vascular o perineural en el estudio histopatológico y CEA prequirúrgico elevado (éstos dos últimos factores están en discusión como únicos factores de riesgo para adyuvancia). Presentación de la neoplasia con obstrucción o perforación. Número de ganglios estudiados en la pieza anatomopatológica insuficiente (<12 puede conllevar infra estadificación).

Además, hay que tener en cuenta la situación funcional del paciente:

- Edad (la limitación en pacientes ancianos es que se prevea esperanza de vida < 5a)
- Sin comorbilidades que contraindiquen el empleo fluoropirimidinas (p.ej. vasculopatía severa), en caso de contraindicación a oxaliplatino puede usarse fluopirimidinas pero no al contrario

En estos casos se aconseja el uso de Fluoropirimidinas (Capecitabina). Los estudios MOSAIC y QUASAR 2(56) han demostrado una mejoría en supervivencia global con el uso de pautas de 5-fluorouracilo en pacientes en estadio II, con un potencial beneficio respecto a la toxicidad relacionada con el tratamiento.

Hay que reseñar que los tumores con inestabilidad de microsátélites (IMS) no parecen beneficiarse del tratamiento adyuvante con 5-fluorouracilo, por lo que la determinación de esta alteración puede ser de utilidad en la toma de decisiones referentes al uso de quimioterapia adyuvante en los pacientes de bajo riesgo en estadio II. Si los factores de riesgo son mayores, como T4 muy indiferenciados, se propone el uso de Fluopirimidinas con Oxaliplatino (FOLFOX), que aumenta la supervivencia global y libre de enfermedad en un 4,2% a los 5 años(57).

- En Estadios III, también tumores localmente avanzados (58), es más alta la probabilidad de recidiva local ó metástasis a distancia, por lo

que es aconsejable realizar tratamiento quimioterápico para reducir estas, e incrementar la supervivencia, utilizando el esquema FOLFOX, igual que en Estadio II. En los pacientes mayores de 70 años y debido a la toxicidad del Oxaliplatino, y al mayor porcentaje de comorbilidades que padecen, se aconseja tratamiento sólo con Fluopirimidinas. Si está contraindicado el uso de Oxaliplatino, se pueden utilizar esquemas de Capecitabina con Leucovorín ó solo Capecitabina. En las neoplasias de Recto, se ha demostrado una menor incidencia de recidivas locales y toxicidad con pautas de quimioradioterapia preoperatorias (Fluopirimidinas + RT) en Estadio I, y en estadio II adyuvancia con Fluopirimidinas con/sin Oxaliplatino.

- En Estadios IV- hasta un 50% de los pacientes desarrollarán diseminación metastásica hepática, bien sincrónicas (15-25%) o metacrónicas (75-85%), y sólo el 20% serán susceptibles de cirugía resectiva. El desarrollo de estas metástasis conlleva un mal pronóstico a largo plazo, disminuyendo la supervivencia a los 5 años al 25% en los tratados resecados y menos del 5% si la enfermedad hepática es irresecable. Se consideran resecables aquellos pacientes que no tengan enfermedad metastásica extrahepática, con número de lesiones inferior a 5, y siempre que la resección deje un volumen hepático adecuado para impedir insuficiencia hepática. Una alternativa

terapéutica para pacientes no resecables, sería la ablación de las metástasis mediante radiofrecuencia.

La Quimioterapia paliativa(59) permite mejorar la calidad de vida y la supervivencia de estos pacientes, y en ocasiones permite realizar un rescate quirúrgico de lesiones previamente irresecables. Con la adicción al 5- Fluoracilo de Oxaliplatino, Irinotecan y terapias biológicas dirigidas, se ha conseguido incrementar la supervivencia de estos pacientes desde los 12 meses hasta los dos años. Las Terapias Biológicas han supuesto un gran avance en los últimos años en el tratamiento de estos pacientes, y son principalmente tres:

- Cetuximab: anticuerpo monoclonal contra el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR)
- Bevacizumab: anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
- Panitumumab: anticuerpo monoclonal humanizado contra EGFR.

Se ha identificado que la presencia de mutaciones en el gen KRAS, es un predictor de respuesta a terapias contra el factor de crecimiento endotelial (anti-EGFR), por lo que cetuximab y panitumumab sólo deben ofrecerse a los pacientes con CCR sin mutaciones KRAS nativo.

Las recomendaciones actuales para el uso de Anticuerpos Monoclonales en el tratamiento de primera línea de CCR Metastásico(59), son:

- KRAS nativo, paciente con buen estado físico y esperanza de vida de más de tres meses:
 - Sin Comorbilidades que contraindiquen: Oxaliplatino Cetuximab + FOLFIRI (Leucovorin + Fluoruracilo + Irinotecán) •Irinotecán Panitumumab + FOLFOX (5-Fluoruracilo + Leucovorín + Oxaliplatino).
 - Con Comorbilidades, Factores de Riesgo ó con Metástasis Hepáticas que se vayan a resear Cetuximab + FOLFIRI (Irinotecan + Leucovorín + 5-Fluoracilo).
 - Con contraindicación o intolerancia a anticuerpos-EGFR Bevacizumab + XELOX (Capecitabina + Oxaliplatino) o FOLFOX 4.
- K-RAS mutado, buen estado físico y esperanza de vida de más de tres meses: Bevacizumab + XELOX (Capecitabina + Oxaliplatino) o FOLFOX 4.

El Tratamiento con radioterapia (RT) en los tumores de recto se utilizará cuando sean T4 adheridos a otros órganos adyacentes o haya signos de recidiva local. En el Recto, la adyuvancia con RT es más efectiva y menos tóxica que en postoperatorio. Asociada a QT preoperatoria, disminuye la tasa de recidiva local y puede aumentar la supervivencia global. De igual forma aumenta la supervivencia libre de enfermedad.

1.5.1 Seguimiento de pacientes intervenidos por CCR

Este protocolo está basado en protocolos establecidos en la Guía de cáncer colorrectal de la Asociación Española de Cirugía, en las recomendaciones establecidas en el proceso de cáncer colorrectal de la Junta de Andalucía y en la evidencia científica existente (58).

- Revisión en consulta
 - Cada 6 meses entre el 1ª y 5ª año tras la cirugía
 - Anual a partir del 5º año.
- Analítica (CEA) en su centro de atención primaria.
 - Cada 3 meses durante los dos primeros años
 - Cada 6 meses entre el 3º y 5º año
 - Anual desde el 5º año
- Colonoscopia
 - Años 1-3-5 desde la cirugía
 - Antes de 6 meses si la colonoscopia preoperatoria fue incompleta
 - Cada 5 años desde el 5º
- TAC
 - Anual hasta el 5º año

Esta pauta de revisiones es orientativa y puede variar en función de las necesidades específicas de la situación de la enfermedad del paciente y de los resultados de las pruebas previas.

CEA: En pacientes tratados quirúrgicamente con intención curativa, la determinación de los niveles de CEA puede detectar de manera precoz recidivas locales o a distancia, incluso antes de que aparezcan los síntomas (NE 2b/B) (sensibilidad 80% y especificidad 70%). Como norma general, los niveles de CEA se normalizan tras 1-4 meses de la intervención, de modo que cuando esta normalización no se produce puede considerarse indicador indirecto de resección incompleta o recurrencia. Se ha estipulado que el intervalo óptimo entre determinaciones de CEA para pacientes en estadio II y III debería ser cada 2 ó 3 meses durante, como mínimo, los 2 primeros años del diagnóstico y anualmente hasta los 5. En pacientes con enfermedad avanzada, la determinación de los niveles permite controlar la respuesta a Quimioterapia. (NE 2b/B)(60)

COLONOSCOPIA: El cribado del CCR es el procedimiento más coste-eficaz y coste-efectivo, respecto al tratamiento del cáncer establecido. Hasta 40% de pacientes con historia de CCR pueden presentar pólipos adenomatosos precursores de nuevos adenocarcinomas. Por tanto, es preceptiva la colonoscopia en el seguimiento, no sólo para detección de recidivas, sino sobre todo para detección precoz de nuevas lesiones.

Los pacientes en los que no es posible hacer colonoscopia completa previa a la cirugía (por estar contraindicada por perforación u obstrucción, por requerir cirugía urgente o porque la lesión neoplásica estenosa la luz) debe realizarse ésta en los primeros 3-6 meses tras la cirugía con el objetivo de identificar lesiones sincrónicas.

TC: Para el seguimiento el TC es una técnica útil en la detección de metástasis hepáticas, afectación ganglionar y de recidivas locales. Para la detección de metástasis hepáticas la TAC tiene mayor sensibilidad que la Ecografía, por lo que resulta útil en aquellos casos en que existen dudas de persistencia de actividad tumoral (postratamientos) o negatividad de otras técnicas de imagen con sospecha evidente (por marcadores tumorales) de actividad tumoral (NE 2a/B).

PET: La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo (AETS), recomienda esta prueba en las siguientes situaciones:

- Re-estadificación de CCR con sospecha de recurrencia y susceptible de cirugía. Los requerimientos son:
 - Metástasis única o múltiple siempre que sea resecable.
 - Aumento progresivo de CEA con imagen (TAC, RM) no concluyente.

- Valoración de respuesta terapéutica de metástasis con imagen no concluyente.

La Coordinación Interniveles son herramientas necesarias para la adecuación del seguimiento a las características personales de cada caso en los comités de tumores de cada centro (reunión para análisis y toma de decisiones sobre los casos individuales del cáncer constituidos por gastroenterólogos, radiólogos, cirujanos, patólogos y oncólogos. En estos comités se consensuan la mejor pauta terapéutica y de seguimiento de cada caso. Un ejemplo de esto es la creación de Planes Integrales Operativos Locales (PIOL) cuyos objetivos son la estandarización de la atención a los pacientes con cáncer colorrectal en las distintas áreas geográficas de sistema Sanitario Público Andaluz.

1.6 EPIDEMIOLOGÍA

El CCR se reconoce como la segunda causa de muerte por cáncer en los países desarrollados y constituye un problema de salud de enorme magnitud, que viene determinada por su elevada incidencia, morbimortalidad y, en consecuencia, por la carga sanitaria y social que implica.

Para la elaboración de este apartado se revisa la bibliografía científica más relevante, los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, y por los grupos cooperativos EUROCARE (EUROCARE-5) y REDECAN (Red

Española de Registros de Cáncer). Las estimaciones presentadas se realizan a partir de los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mediante la plataforma *The Global Cancer Observatory* (GCO), que reúne los esfuerzos de los distintos proyectos de la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) entre los que se encuentran GLOBOCAN, *Cancer Incidence in Five Continents* (CI5); *International Incidence of Childhood Cancer* (IICC); además de *Cancer Survival in Africa, Asia, the Caribbean and Central America* (SurvCan) y a partir de los datos que proyecta el Observatorio del Cáncer de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)(60).

La mayoría de los CCRs se localizan en el colon descendente, seguido del colon sigmoide y del recto. En los últimos años se ha observado a nivel mundial un cambio gradual hacia el lado derecho o proximal de cáncer del colon con el mayor aumento relativo en la incidencia de tumores primarios en colon ascendente y ciego. Este cambio en la distribución anatómica de los CCR puede estar, en parte, relacionado con mejoras en el diagnóstico y tratamiento, y un aumento de la detección y extirpación de pólipos adenomatosos en el colon distal. Por otra parte, la biología también puede diferir entre los CCR del colon derecho e izquierdo. Por ejemplo, los adenomas serrados, que son más planos y más difíciles de visualizar endoscópicamente, y que llevan característicamente mutaciones BRAF V600E y dan lugar a CCR con inestabilidad de microsatélites (IMS), son más comunes en el colon derecho. Aunque todas estas circunstancias pueden contribuir a un cambio de la localización del CCR hacia proximal, también

parece haber un aumento real en la incidencia de cáncer de ciego y colon ascendente sobre todo en personas de mayor edad.

1.6.1 Prevalencia

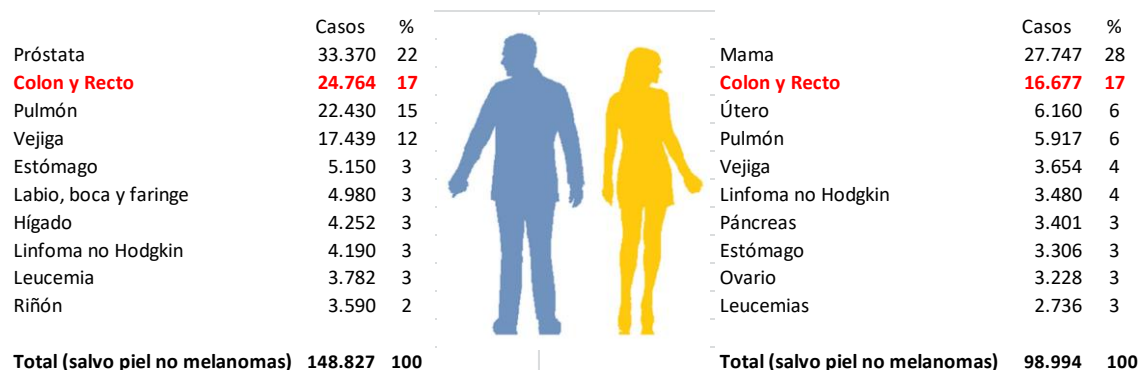
La prevalencia es el número o la proporción de la población con una enfermedad determinada durante un periodo o en un momento concreto. La definición de prevalencia más frecuentemente empleada es el número de pacientes diagnosticados con un tipo concreto de tumor que continúan vivos a los 5 años del diagnóstico. La prevalencia incluye por tanto los pacientes con diagnóstico reciente pero también los pacientes diagnosticados en el pasado.

La prevalencia se encuentra determinada por la supervivencia, es decir, la prevalencia es más elevada en los tumores con mayor supervivencia; mientras que los tumores con supervivencia más cortas tienen una menor prevalencia, aunque se diagnostiquen más frecuentemente.

La prevalencia estimada a nivel mundial para la población general de CCR a 5 años en el año 2012 es de 3.543.582. Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en España en ambos sexos para el año 2017 (población general) es de 89.635 casos.

1.6.2 Incidencia

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad del mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el mundo en el año 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN, de la OMS). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de casos aproximadamente en el año 2035.



Las 10 localizaciones más frecuentes de cáncer por género en España (REDECAN 2015)

Ilustración 3. Incidencia de Cáncer por sexo (REDECAM 2015).

La incidencia es el número de casos nuevos de una enfermedad en una población y en un periodo de tiempo determinados. Puede expresarse como el número absoluto de casos nuevos en un año o como el número de casos nuevos por 100.000 personas por año(60).

Incidencia estimada a nivel mundial en el año 2012 (excluidos tumores cutáneos no melanoma) es para el CCR de 1.360.602. en España en el año 2017 (ambos sexos) fue de 34.331. El CCR es el tercer cáncer más común en hombres con 24.764 casos en España en 2015 y el segundo más frecuente en mujeres con 16.677 casos (ilustración 3). Los datos correspondientes a las estimaciones de incidencia de CCR para el año 2018 están recogidos en la tabla 2.

Datos epidemiológicos más recientes de Estado Unidos de la base de datos de la SEER y de otros registros de países occidentales sugieren que la incidencia de CRC está aumentando en el grupo de pacientes menores de 50 años, mientras que está disminuyendo en grupos de edad mayores. Este aumento de incidencia en personas jóvenes está relacionado con tumores de colon izquierdo y recto además suelen ser tumores sintomáticos y en estadios avanzados. Actualmente el cribado de CCR no se recomienda en pacientes menores de 50 años, excepto en casos de antecedentes familiares o existencia de síndromes hereditarios.

Tabla 2. Estimación de las tasas de incidencias por CCR en 2018 de España, Comunidad Europea (Eu-28) y Europa.

Estimaciones de Incidencia en 2018	España	Unión Europea (EU-28)	OMS_Europa (EURO)
Número de caso nuevos	37.172	378.445	499.667
Tasas brutas	80,1	74,2	67,2
Tasas ajustadas ASIRe	76,5	71,3	68,4
Tasas ajustadas ASIRw	33,4	30,9	30,0
ASIRe: Tasas de incidencia ajustadas por edad a la población europea (nueva); ASIRw: Tasas de incidencia ajustadas por edad a la población mundial. Tomado de <i>European Cancer Information System (ECIS)</i> . Comisión Europea			

1.6.3 Mortalidad y supervivencia

La mortalidad es el número de fallecimientos ocurridos en un periodo de tiempo concreto en una población determinada. Suele expresarse como el número de fallecimientos por año o como el número de fallecimientos por 100.000 personas por año.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, y fue responsable de 8,8 millones de muertes en el año 2015 (OMS). Atendiendo a predicciones poblacionales, se calcula que el número de muertes producidas por tumores aumentará a más de 14 millones en el año 2035.

Estimación de la mortalidad en el mundo para el año 2012 en la población general (tumores más frecuentes) es de 693.933. El CCR presentaría tasas de 15,8 y de 9,2 /100.000 en varones y mujeres, respectivamente; habiendo experimentado un descenso del 6,7% y del 7,5 % desde 2012 tenderían a reflejar las mejoras en el diagnóstico precoz y en los nuevos tratamientos (61).

Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en España en 2016 en la población general fueron el cáncer de pulmón (22.187 muertes) y el CCR (11.781 muertes), seguidos a una gran distancia del cáncer de páncreas (6.789 casos), el cáncer de mama (6.477 muertes), y de próstata (5.752 muertes).

En números absolutos, España es uno de los países europeos en los se diagnostican más tumores y en los que fallecen un mayor número de personas

por cáncer. Sin embargo, puesto que contamos con una de las mayores esperanzas de vida del mundo, si comparamos la incidencia y mortalidad ajustadas por edad, la incidencia y la mortalidad en Europa se homogenizan.

La supervivencia es la probabilidad de sobrevivir a un periodo de tiempo determinado desde el diagnóstico del tumor. Se basa en los datos de mortalidad que incluyen tanto la atribuida al tumor como a cualquier otra causa. Recientemente, se publicaron los datos de supervivencia entre los años 2000-2007 de los registros españoles participantes en el proyecto EUROCORE estos datos no pueden reflejar los avances de tratamiento acontecidos en los últimos 10 años, que serán evidentes en la próxima década, confirma el aumento de supervivencia de los últimos años. La supervivencia de los pacientes con cáncer en nuestro país es similar a la del resto de países de nuestro entorno situándose en España en un 53 % a los 5 años.

Datos recientes indican que la supervivencia de los pacientes con cáncer ha aumentado de forma continua en los últimos años en todos los países europeos para el CCR en probable relación con los avances en el tratamiento. Otro campo de actuación en la mejora de la supervivencia, lo constituye el control de los grupos de alto riesgo.

Dada la imposibilidad, fundamentalmente socioeconómica, de realizar amplias campañas de cribaje de CCR, resulta inexcusable la actuación al menos

sobre los grupos de alto riesgo, es decir, el estudio de los individuos en los que la posibilidad de aparición de CCR es mayor que en la población standard.

Tabla 3. Estimación de las tasas de mortalidad por CCR en 2018 para España, Comunidad Europea y Europa en General.

Estimaciones de Mortalidad en 2018	España	Unión Europea (EU-28)	OMS_Europa (EURO)
Número de caso nuevos	16.683	173.233	242.483
Tasas brutas	36,0	34,0	32,6
Tasas ajustadas ASRe	33,0	32,2	33,3
Tasas ajustadas ASRw	12,0	11,7	12,6
ASRe: Tasas de mortalidad ajustadas por edad a la población europea (nueva); ASRw: Tasas de incidencia ajustadas por edad a la población mundial. Tomado de <i>European Cancer Information System (ECIS)</i> . Comisión Europea			

Tabla 4. Estimación de la supervivencia por CCR en 2018 para España y Europa (no disponemos de los datos de Eu-28).

Estimaciones de Supervivencia en 2018	España	Promedio Unión Europea
Número de casos	141.934	7.478.936
Supervivencia a 1 año (IC95%)	71,48 (71,24-71,73)	72,53 (72,48-72,58)
Supervivencia a 5 años (IC95%)	52,82 (52,52-53,13)	54,15 (54,08-54,22)
ASRe: Tasas de mortalidad ajustadas por edad a la población europea (nueva); ASRw: Tasas de incidencia ajustadas por edad a la población mundial. Tomado de <i>European Cancer Information System (ECIS)</i> . Comisión Europea		

Con el fin de disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada al CCR se han diseñado diferentes estrategias entre la que destacan los barridos poblacionales (screenings) para detección precoz mediante test de sangre oculta

en heces bienal -colonoscopia en personas de entre 50 y 69 años han demostrado ser eficaces.

Por todos los datos descritos hasta ahora podemos deducir que los factores predictivos de supervivencia para pacientes con cáncer CCR son múltiples y heterogéneos. El CCR como la mayoría de las neoplasias surge de la interacción de características del individuo con su medio ambiente, por lo que existen factores individuales que pueden influir la variabilidad de la supervivencia en pacientes dentro del mismo estadio. Los estudios clínicos con la integración de mega datos con la ayuda de la informática están continuamente trabajando sobre la manera de integrar toda esta información pronóstica novedosa junto con el estadio para crecer en el conocimiento de las distintas etapas de la enfermedad y poder estimar una probabilidad de supervivencia de cada paciente y avanzar en la nueva era de la medicina personalizada.

Sin embargo, la determinación precisa del pronóstico individual de los pacientes con CCR continúa siendo un reto. Los sistemas actuales de estadificación en pacientes con CCR están basados en modelos de regresión logística y en general utilizan relativamente pocas características del paciente en comparación con la amplitud de información que generalmente está disponible.

El sistema TNM de clasificación pronóstica de la AJCC (8º edición), es el sistema predictivo más ampliamente utilizado. Las variables incluidas son el estadio tumoral, el estado nodal, y existencia de metástasis. El sistema inicial no

considera determinadas características del paciente o del propio tumor que han mostrado correlación con la recurrencia o la supervivencia.

La calidad y relevancia clínica de los modelos predictivos de mortalidad y recurrencia en pacientes con cáncer en general y con CCR en particular, se encuentran enmarcadas dentro de un ámbito desconocido. Se ha creado nuevos grupos de trabajo dentro de la AJCC para intentar analizar la manera de integrar la información pronóstica disponible junto con el estadio histológico para individualizar el pronóstico de los pacientes con CCR y personalizar su manejo clínico. Este grupo de trabajo ha revisado la calidad y aplicabilidad de los modelos pronósticos descritos actualmente y como resultado de ello Alyson et al. han publicado reciente una revisión sistemática donde se describen los resultados de su trabajo (54). Se han descrito 53 modelos pronósticos muchos de los cuales sin una metodología adecuada o desconocida en pacientes con CCR, la mayoría han sido diseñados para orientar el manejo clínico de pacientes en estadio IV, ya que una pequeña parte de ellos se han desarrollado en pacientes en estadio I-III. Solo la mitad de los estudios incluidos en la revisión realizaron validez interna y externa de sus y de estos la mayoría no la realizaron con la metodología estadística adecuada. Por lo que la revisión concluye, basándose en la heterogeneidad de los estudios incluidos y la incompleta o inadecuada metodología usada, que actualmente permanece la necesidad de establecer el pronóstico individual de pacientes dentro del mismo estadio histológico y que sería importante establecer una guía para crear nuevos

modelos de supervivencia en pacientes con CCR. De los diez modelos predictivos de supervivencia en pacientes con CCR en estadio I-III incluidos en la revisión sistemática publicada por Alyson, dos se desarrollaron a partir de datos de pacientes con cáncer de colon y recto (ninguno de ellos desarrolla la validación externa del modelo), tres en pacientes con cáncer de colon y cinco en pacientes con cáncer de recto. A continuación, detallamos los nomogramas desarrollados en pacientes con CCR la mayoría de ellos en Hospitales americanos y británicos con mayor calidad metodológica:

- *Memorial Sloan-Kettering* (Colorectal Cancer: *Prediction Tools*. *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*) es un sistema predictivo con una plataforma online para predecir la recurrencia y la supervivencia en pacientes con cáncer de colon sometidos a cirugía con intención curativa. El nomograma descrito para predecir la probabilidad de recurrencia se desarrolla a partir de los datos de 1.320 pacientes y el creado para la supervivencia se basa en los datos de la SEER e incluye 128.853 pacientes (62). El modelo predictivo de recurrencia introduce las siguientes variables (el modelo de supervivencia utiliza un subconjunto): edad, sexo, localización tumoral, CEA prequirúrgico, estadio tumoral, grado de diferenciación, invasión linfocascular, invasión perineural, número de ganglios linfáticos positivos y negativos con quimioterapia adyuvante. Se estima la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a los cinco y diez años tras la cirugía.

La principal limitación de este modelo predictivo es la ausencia de intervalos de confianza adecuados y validación externa.

- *Mayo Clinic* (www.mayoclinic.com/calcs) *Numeracy* es una calculadora desarrollada a partir de los datos de 3.302 pacientes procedentes de siete ensayos clínicos desarrollados en pacientes con cáncer de colon en estadio II-III en Estados Unidos para estudiar el beneficio de distintos tipos de quimioterapia adyuvante. Las variables incluidas en el modelo son el número de ganglios (variable categorizada), el estadio tumoral categorizado, el grado de diferenciación tumoral y la edad categorizada. El sistema predice la supervivencia a los 5 años. Este modelo a pesar de realizar validación interna y externa con una adecuada metodología estadística tiene la limitación de incluir pocas características de los pacientes y la ausencia de intervalos de confianza en cada predicción realizada (62).
- ACCENT es un modelo creado a partir de datos de 15.936 pacientes procedentes de varios ensayos clínicos en paciente con CCR en estadio III para predecir la supervivencia global y el tiempo de recurrencia; la novedad es que incorpora un amplio espectro de características clínicas de los pacientes. Los parámetros incluidos son la edad, el sexo, la raza, el performance status, grado histológico tumoral, estadio tumoral, ratio ganglios, número y localización del tumor y tipo de tratamiento adyuvante. Este modelo fue sometido a validación interna y externa.

Además, se realizó una comparación con el modelo *Numerancy* y el resultado fue que este nuevo modelo predice mejor los resultados que el modelo anterior (41).

Existen otros nomogramas pronósticos en pacientes con CCR que no han sido publicados y se han desarrollado solo como calculadoras online para predecir la probabilidad de muerte en paciente con CCR. Entre los más conocidos destaca *Adjuvant Online* (www.adjuvantonline.com). En 2011, Gill et al. realizaron una validación externa y comparación de los modelos *Numeracy* y *Adjuvant* usando los datos de pacientes intervenidos por CCR en Gran Bretaña; los autores concluyeron que ambos modelos son útiles para predecir los resultados de pacientes con CCR en estadio II y III.

Es necesaria la creación de modelos predictivos de supervivencia para la gestión de los pacientes con CCR, pero la fiabilidad de estas herramientas está comprometida por la mala calidad metodológica de las mismas. De otro lado, no existen modelos que incorporen nuevas variables pronósticas descritas como marcadores inflamatorios preoperatorios, marcadores moleculares u otros factores o situaciones cuyo papel en el pronóstico no está totalmente establecido.

Tras realizar una revisión de la bibliografía actual, no hemos encontrado ningún modelo pronóstico a partir de los datos de pacientes andaluces ni españoles con CCR. Por este motivo, creemos que es necesario investigar

cuales son los factores predictivos de recurrencia y mortalidad en nuestra población de pacientes intervenidos por CCR y analizar también el papel de posibles nuevos factores pronósticos descritos como la determinación del binomio SP/NK1-R. Una vez que conozcamos las variables relacionadas con la recidiva tumoral y la mortalidad específica por cáncer podremos integrar toda esta información. Hemos tenido presente la principal crítica realizada por Mahar et al. sobre la falta de calidad de los sistemas de pronósticos disponibles y por este motivo consideramos que es necesario realizar validación interna y externa según la metodología estadística.

Entre los factores de alto riesgo y las lesiones preneoplásicas se han descrito los siguientes:

Factores de riesgo

El CCR parece estar causado tanto por factores hereditarios como ambientales, pero precisamente porque desconocemos las causas exactas de su aparición y el tratamiento profiláctico resultaría poco resolutivo, se impone el análisis y seguimiento de las circunstancias que pueden determinar el incremento de la posibilidad de desarrollo de CCR en una persona concreta.

- Edad: El cáncer de intestino grueso es poco común en pacientes menores de 40 años es un carcinoma de personas de más de 50 años, con un pico máximo de incidencia alrededor de los 70. Datos epidemiológicos más recientes de Estado Unidos y de otros

registros de países occidentales sugieren que la incidencia de CRC está aumentando en el grupo de pacientes menores de 50 años, mientras que está disminuyendo en grupos de edad mayores (60,61). Este aumento de incidencia en personas jóvenes está relacionado con tumores de colon izquierdo y recto; además suelen ser tumores sintomáticos y en estadios más avanzados.

- Dieta: es un factor controvertido pero algunos datos sugieren que dietas ricas en grasas (carne roja, alimentos fritos y productos diarios ricos en grasas) incrementan la posibilidad de desarrollar CCR, mientras que dietas ricas en fibras (frutas, vegetales, cereales integrales) parecen reducir el riesgo (64). El efecto de otras numerosas sustancias como minerales, vitaminas y fármacos está actualmente en estudio.
- Genética: los factores genéticos parecen determinar una susceptibilidad personal al CCR, mientras que la dieta y otros factores ambientales podrían determinar cuáles de los individuos al riesgo desarrollarán realmente la enfermedad. Alrededor del 80% de los pacientes con CCR corresponde a casos esporádicos, sin evidencia aparente de tener una alteración hereditaria. El 20% restante de los pacientes, tiene una historia familiar de CCR que sugiere una contribución genética, exposiciones ambientales comunes a los miembros familiares o una combinación de ambos.

Se han identificado mutaciones genéticas como causa de riesgo heredado de cáncer en algunas familias con tendencia al cáncer. Estas mutaciones supondrían sólo un 5-6 % de los casos de CCR. Se necesitan, al menos, de 5 a 7 alteraciones moleculares de grado mayor para que una célula epitelial normal progrese de manera clonal hasta el CCR. Algunos cambios importantes pueden incluir pérdida de cromosomas 5q, cromosoma 18q, cromosoma 17p y mutación de los oncogenes k-ras (p21) y c-myc (p26). Los genes más importantes afectados por estas pérdidas cromosómicas son el APC (5q), el DCC/DPC/JV 18 (18q) y p53 (17p) respectivamente. Las pérdidas cromosómicas se asocian con inestabilidad en un nivel cromosómico y molecular. Entre los sucesos más tempranos en la vía de progresión del CCR, está la pérdida del gen APC, lo que parece ser consistente con su importante papel en predisponer a ciertas personas, con mutaciones en la línea germinal, hacia tumores colorrectales. Las alteraciones adquiridas, o heredadas, en los genes de reparación del DNA, también juegan un papel predisponente en las mutaciones. El conocimiento derivado del estudio de síndromes de CCR hereditario, proporciona claves importantes para el desarrollo de la progresión tumoral en personas sin anormalidades en la línea germinal.

1.6.3.1 Calidad de vida

A pesar de sus claros beneficios clínicos para los pacientes los pacientes operados de resección colon sigmoidea con/sin enteroanastosis muestran efectos adversos que incluyen pérdida de la imagen corporal, actividad sexual deteriorada (en el 53% de los pacientes), fugas (39%), molestias en la ropa (34%), problemas de privacidad al vaciar la bolsa (32%) y sensación de falta de atractivo (31%) (65). La creación de la estoma temporal se asocia con sentimientos de incertidumbre, estigma y preocupaciones sobre la divulgación (66). Las complicaciones adicionales relacionadas con la estoma incluyen dermatitis, alto rendimiento de heces, deshidratación y hernia peristomal (67). Estos eventos psicológicos y físicos adversos son importantes para evitar ya que estas afecciones pueden volverse crónicas. Un estudio retrospectivo informó que el cierre final de la estoma fue posible en el 90% de los pacientes que recibieron ileostomía temporal en asa y el tiempo promedio hasta el cierre fue de 152 ± 2 días. Esto resalta la necesidad de identificar los factores relacionados con el paciente y la cirugía que pueden influir en los resultados físicos y psicológicos de la enterostomía temporal.

Se están realizando ensayos clínicos en cuidados paliativos con el objetivo de encontrar mejores formas de reducir los síntomas y los efectos secundarios de los tratamientos actuales para el CCR a fin de mejorar el bienestar y la calidad de vida de los pacientes.

En el manejo perioperatorio del CCR es difícil modificar las actitudes clásicas incluso con la evidencia científica. Uno de los avances que más ha contribuido a mejorar el resultado tras cirugía colorrectal es la rehabilitación multimodal también llamada *fast-track*, se trata de un programa que pretende acelerar la recuperación, reduciendo la morbilidad y acortando las estancias. Se basa en la actuación conjunta de cirujanos, anestesistas y personal a cargo del paciente con el objetivo de disminuir la respuesta a las alteraciones fisiopatológicas inducidas por la agresión quirúrgica. Aspectos como la ingesta preoperatoria de carbohidratos, evitar la preparación de colon, reducir la fluidoterapia o mantener la normotermia son de gran importancia. Del mismo modo, la analgesia epidural, eliminación de sondas y drenajes, alimentación precoz o una cirugía menos invasiva pueden mejorar el íleo postoperatorio y otras complicaciones. Existe importante evidencia de que el uso conjunto de estas y otras medidas contribuye a una mejor recuperación posquirúrgica, aunque se sigue utilizándolas muy poco en la práctica (46).

1.7 LA SP Y EL RECEPTOR NK-1R

1.7.1 Generalidades de la SP/NK-1R

La SP es un péptido de cadena corta compuesto por once aminoácidos de la familia de las TK, de los que los seis correspondientes al extremo C-terminal son esenciales para su actividad biológica a través de la unión con su receptor

específico NK1 (NK1-R); está ampliamente distribuida en toda la economía así la localizamos en el sistema nervioso central y el periférico de los seres humanos. En la progresión neoplásica objeto de nuestro estudio el sistema SP/NK1-R muestra una sobreexpresión variable actuando como neurotransmisor y neuromodulador (acción mitogénica y antiapoptótica) y tiene además otras cuatro funciones, función autocrina (induce la mitogénesis al secretarse en las células tumorales) (68,69), paracrina (induce acción mitogénica en las células endoteliales) (70–72), endocrina (secreción de la SP al torrente sanguíneo) y la recientemente descrita como autocrina/nucleocrina (regulando funciones nucleares) (73–75) (figura 4). Tiene otras funciones nociceptiva,

espasmogénica, hipotensora, sialogoga, está involucrada en el edema y broncoconstricción. Es el mayor mediador de la inflamación neurogénica.

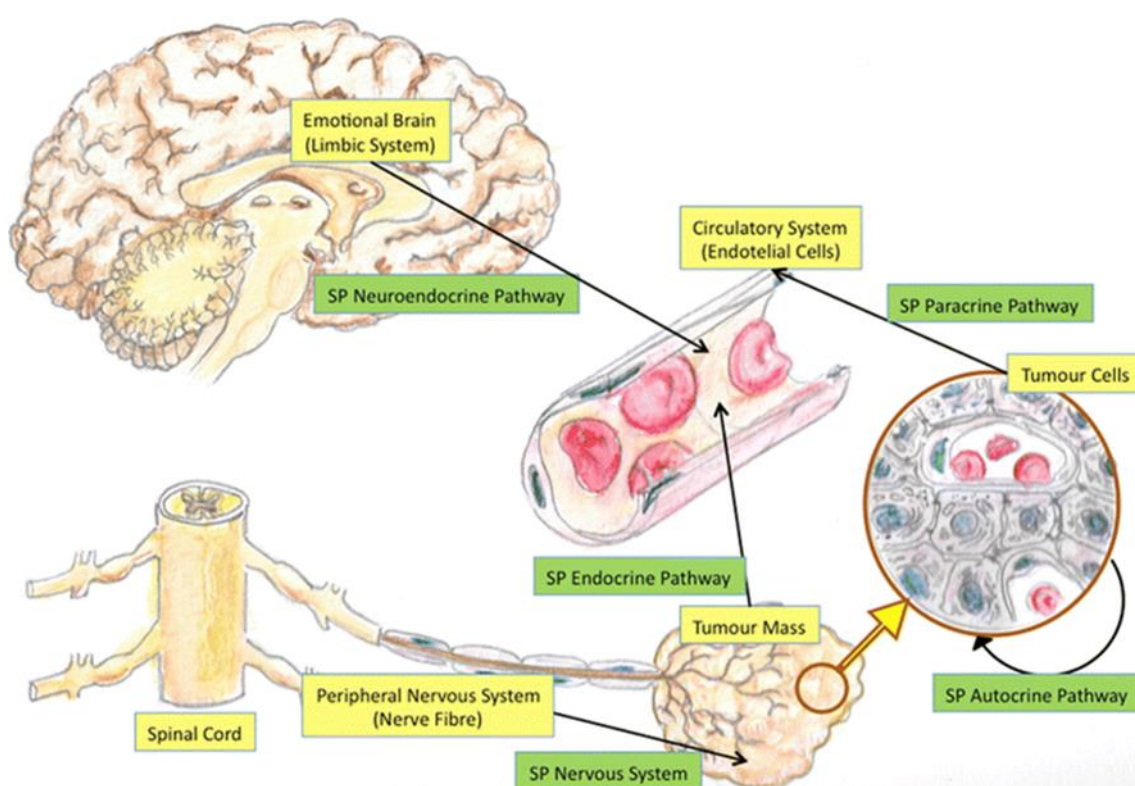


Ilustración 4. Vías de acción de la SP (Tomado de Muñoz M, Coveñas, R, Esteban F, y Redondo M; 2015).

1.7.2 Neuronas y neurotransmisores.

El científico y premio Nobel, Don Santiago Ramón y Cajal, identificó en 1888 a la neurona como la unidad funcional básica del SNC (observada por

primera vez con microscopio electrónico en 1950). La comunicación entre éstas (neurotransmisión) se realiza mediante la transmisión sináptica, eléctrica o química.

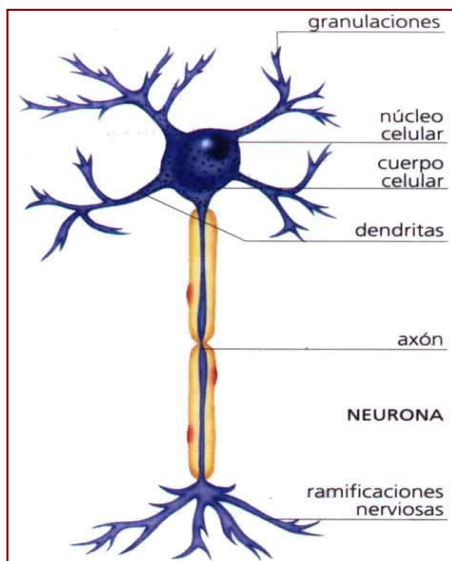


Ilustración 5. Imágen de una neurona.

La neurona como unidad principal tiene dos funciones, la propagación del potencial de acción (impulso o señal nerviosa) a través del axón y su transmisión a otras neuronas a células efectoras para inducir una respuesta esta comunicación entre éstas (neurotransmisión) se realiza mediante la transmisión sináptica, eléctrica o química. En el

ser humano, la mayor parte de las sinapsis son de tipo químico y están mediadas por sustancias químicas denominadas clásicamente neurotransmisores. Tras la llegada de un impulso nervioso a la neurona, se produce la liberación de los neurotransmisores desde el terminal presináptico hacia el espacio sináptico difundiendo posteriormente hasta el terminal postsináptico, donde se unen a sus receptores específicos. A su vez, las sinapsis pueden ser excitadoras, inhibitoras o moduladoras, dependiendo del neurotransmisor liberado por la célula presináptica y de los receptores específicos de la membrana postsináptica (76).

1.7.3 Neuropéptidos:

El concepto de “neurosecreción” o “neurona secretora” surgió gracias a las investigaciones de Scharrer E. (1945) y de Bargmann W. (1968) los cuales establecieron que existen neuronas con la capacidad de sintetizar péptidos, transportarlos como gránulos secretorios a lo largo del axón y almacenarlos en la terminal axónica, donde son liberados.

Estos neurotransmisores de naturaleza peptídica, pueden a su vez coexistir con neurotransmisores clásicos (monoaminas y aminoácidos)(77), permitiendo que exista mayor posibilidad de acción y surgiendo el concepto funcional de co-transmisión que supone la regulación de un neurotransmisor peptídico o no (clásico) por otro de naturaleza peptídica. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, que son sintetizados en la región presináptica de la terminación nerviosa y almacenados en vesículas hasta su utilización, los neuropéptidos son sintetizados en los ribosomas del soma celular en forma de precursores de gran tamaño molecular, sin que exista un mecanismo eficiente de recaptación de éstos (77).

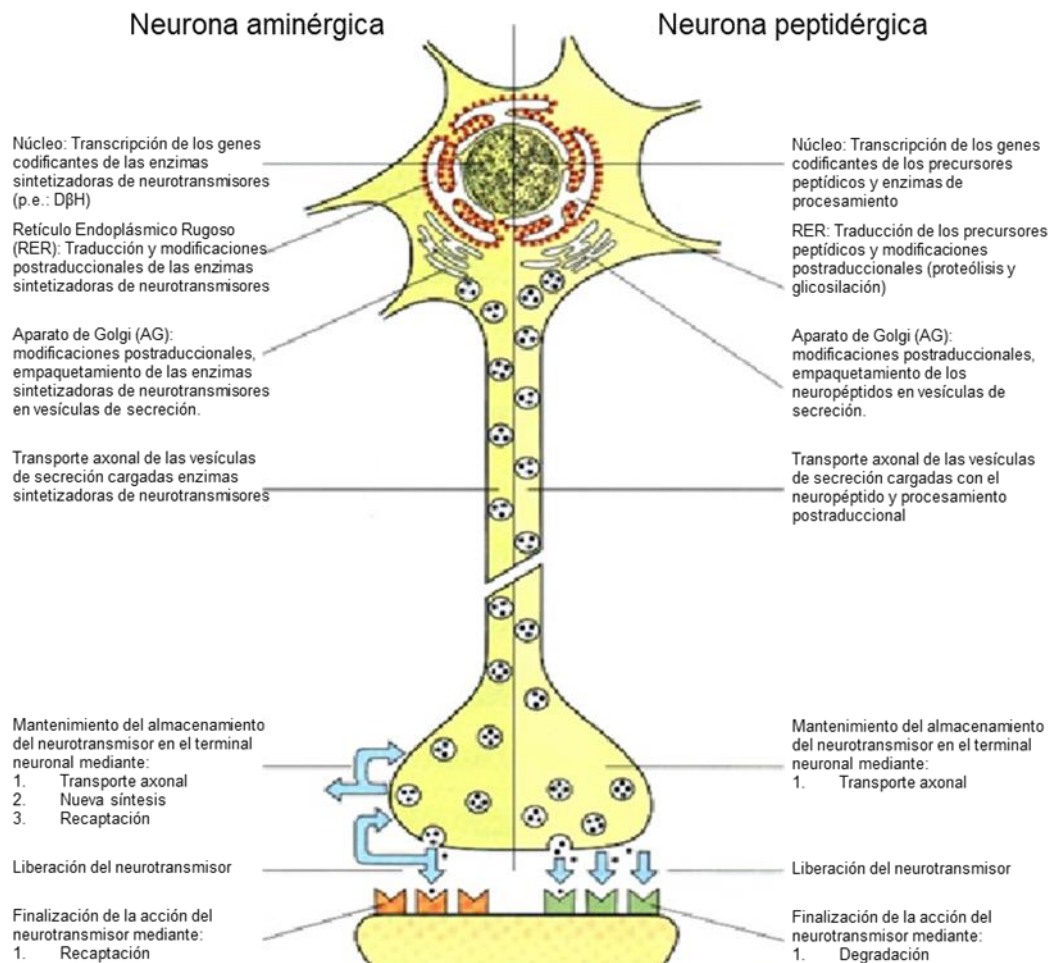


Ilustración 6. Diferencias entre neurona aminérgica y peptidérgica.

Otro hecho a tener en cuenta es que las concentraciones encontradas de neuropéptidos en el SNC sean sensiblemente menores que las de los neurotransmisores clásicos (mil veces menor que las monoaminas y cien mil veces menor que los aminoácidos), hecho que se ve compensado por la alta eficacia y capacidad de los neuropéptidos para activar a sus respectivos receptores, con una afinidad diez mil veces mayor que la de los

neurotransmisores clásicos, lo que compensa a su vez el mecanismo de regulación menos eficaz de los péptidos.

Para clasificar un péptido como neurotransmisor potencial, ha de cumplir una serie de requisitos, ya establecidos para definir a los neurotransmisores clásicos (78).

- Concentraciones relativamente altas de la sustancia en el terminal presináptico.
- Mecanismos especializados en la neurona para la síntesis y degradación del neurotransmisor.
- Liberación del péptido por estímulos despolarizantes dependientes de Ca^{2+} .
- Ha de modificar la excitabilidad eléctrica de neuronas aisladas.
- La acción de un antagonista debe bloquear las respuestas desencadenadas por el neurotransmisor potencial o por estimulación nerviosa.

Una de las clasificaciones más completas de los neuropéptidos los clasifica en dos grandes familias A) Las peptídicas que incluyen los opiáceos, los neurohipofisarios, las distintas secretinas, las insulinas, gastrinas, las somatostatinas, polipéptidos pancreáticos y la familia de taquicinas objeto del presente estudio.

La otra familia son los neuropéptidos son las no peptídicas: las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario, así como otras hormonas circulantes y digestivas (79).

Aunque existen aún muchas incógnitas sobre algunas de las sustancias incluidas en esta clasificación; nos centraremos en una de las más estudiadas hasta el momento, la Sustancia P, objeto de nuestro estudio.

1.7.4 Taquicininas.

Las taquicininas (TK) son una familia de péptidos ampliamente distribuida en animales vertebrados e invertebrados (78,79), tradicionalmente clasificada como neurotransmisores y a la que pertenece la SP.

Además de la distribución clásica de las TK en el SNC y periférico, han sido también detectadas no sólo en células no neuronales de los sistemas inmune , inflamatorio (81) y endotelio vascular , sino también en poblaciones celulares de la glándula pituitaria (82), circulando en sangre (82) e incluso en la placenta (83), órgano totalmente desprovisto de nervios.

Dentro de la familia de las TK de mamíferos, la primera en ser descubierta fue la SP (Von Euler U.S. y Gaddum J.H. 1931); posteriormente se describieron la Neurokinina A (NKA) y la Neurokinina B (NKB) (84) y las formas elongadas de la NKA, el Neuropéptido K (NPK) (85) y el Neuropéptido gamma (NP γ) (86), cuyas funciones aún no han sido totalmente definidas. En 2000, se encontró una

nueva TK en ratón que se llamó (HK-I) (86) expresada principalmente en tejido no neuronal y que llevó a la creación de un nuevo grupo de TK, las endokininas (87).

Se han descrito otros péptidos de especies no mamíferas pertenecientes a esta familia: Eledoisina, Fisalemina y Kassina (88).

La familia de las TK presenta característicamente un grupo amida en el extremo carboxi-terminal conservando la secuencia común: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, donde X es siempre un residuo hidrófobo (Val o Ile) o aromático (Tyr o Phe), hasta completar los 10-11 aminoácidos que generalmente posee la estructura (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencia lineal de aminoácidos de las taquicininas.

Estructura de las Taquicininas	
SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Phe- Phe -Gly-Leu-Met-NH ₂
NKA	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe- Val -Gly-Leu-Met-NH ₂
NKB	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe- Val -Gly-Leu-Met-NH ₂
NPK	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe- Val -Gly-Leu-Met-NH ₂
NP _γ	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe- Val -Gly-Leu-Met-NH ₂
Hemokina-I	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe- Phe -Gly-Leu-Met-NH ₂
Fisalemina	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe- Tyr -Gly-Leu-Met-NH ₂
Eledoisina	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe- Ile -Gly-Leu-MetNH ₂
Kassina	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe- Val -Gly-Leu-MetNH ₂

La amidación de la metionina terminal es esencial en su funcionamiento, y por ello los péptidos tachykinin-like de los invertebrados, con una arginina en el C-terminal, son incapaces de activar los receptores taquicinérgicos (RTK) de mamíferos.

La secuencia común carboxi-terminal es esencial para la activación e interacción con su receptor específico, mientras que las diferentes secuencias aminoterminales le provee de la especificidad para cada subtipo de receptor (89). Las TK de mamíferos están codificadas por tres genes diferentes, llamados preprotataquicinina TAC 1, TAC3 y TAC4, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Genes (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclatura) de la Organización del Genoma Humano (HUGO), sustituyendo los términos clásicos PPT-A/PPT-I, PPT-B/PPT-II y PPT-C/PPT-III por TAC 1, TAC 3 y TAC 4, respectivamente (90) ilustración 4.

El gen TAC 1 puede generar cuatro formas diferentes de péptidos. Por medio de diferentes procesamiento a partir de segmentos del gen y uniones alternativas del ARNm, se producen las formas α TAC1 y δ TAC1 (que codifican solo para la SP) y las formas β TAC1 y γ TAC1 (que codifican tanto para la SP como para la NKA) (91). La inclusión o exclusión diferencial del exón 4 en β TAC1 y γ TAC1 permite la formación de dos péptidos que son formas elongadas de la NKA, el neuropéptido K (NPK) y el neuropéptido γ (NP γ) (92).

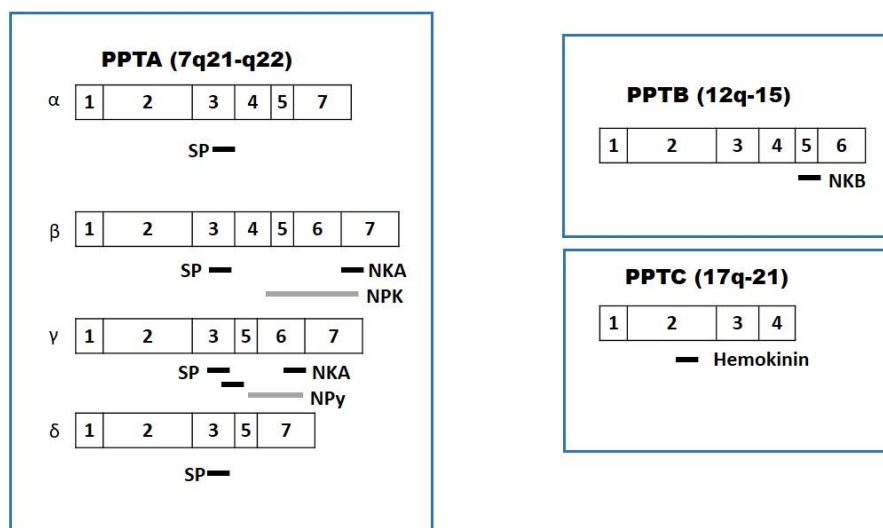


Ilustración 7. Esquema de la estructura de los genes humanos PPTA (TAC1), PPTB (TAC3) y PPTC (TAC4). Los exones de cada uno de los genes están expresados por números.

Diferentes estudios han demostrado la expresión del gen TAC1 en todos los tejidos humanos, particularmente en cerebro, corazón, bazo, colon, cerebro fetal y glándula mamaria (93).

Sin embargo, existe controversia en cuanto a su expresión en la placenta, tejido no innervado por el sistema nervioso periférico, puesto que según Page N.M. et al. (2001, 2003) este gen está ausente de la placenta, mientras que Marzioni D. et al. (2005), demuestran por hibridación in situ, la expresión en placentas humanas de ARNm específico para SP.

En cuanto al gen TAC3 (PPT II según anterior nomenclatura), éste codifica exclusivamente para la NKB (94) y su organización se asemeja bastante a la del gen TAC1 en humanos; aunque su procesamiento no es tan complejo, existen evidencias de la existencia en humanos de dos isoformas precursoras de TAC3, la α TAC3 y la β TAC3 (95) y de una forma elongada de la NKB en el cerebro de rata (96).

Varios estudios inmunorreactivos han dado negativos para la presencia de la NKB en tejidos periféricos (97), pero sí que se encuentran niveles altos de ARNm de NKB en la placenta humana. Además, recientemente se ha visto que la distribución de la expresión de TAC3 en tejidos humanos era igual o incluso más amplia que la de TAC1 (97).

Por último, el gen más recientemente identificado perteneciente a la familia de las TK, es el gen TAC4 (anterior PPT III) (97). Éste puede ser procesado de manera que da origen a cuatro variantes alternativas: α , β , γ y δ codificando cada una para cuatro péptidos diferentes clasificados como endokinina A EKA, EKB, EKC y EKD. Mientras que la EKB está codificada por las cuatro isoformas, la EKA y la EKC lo están sólo por el α TAC4 y la EKD por el β TAC4 (98).

La distribución de las cuatro isoformas de TAC4 no ha sido definida completamente, aunque sí se sabe que α y β TAC4 se expresan en tejidos periféricos humanos, particularmente en la placenta (98).

1.7.5 Receptores taquicinérgicos:

Los receptores de las taquicininas interactúan con receptores específicos de membrana. Tres RTK distintos NK1R, NK2R y NK3R, se han clonado en diferentes especies incluyendo el ser humano (99). Pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, que realizan sus acciones a través de la activación de una o más proteínas G (*guanina nucleotide-binding regulatory proteins*). Por su estructura típica, también se les llama receptores de los siete dominios transmembrana hidrofóbicos.

La unión de un agonista a su receptor específico en la superficie celular causa un cambio conformacional en el receptor que permite la interacción con la proteína G; se forma así un complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G.

La forma activada de la proteína G se disocia del receptor y activa la proteína efectora, modulando los niveles de segundos mensajeros intracelulares (figura 10).

Las proteínas G activadas median la estimulación o inhibición de enzimas efectoras y canales iónicos, incluyendo: adenil ciclasa, guaninil ciclasa, fosfolipasa C y A2, y canales de calcio y potasio (100).

La interacción del AMPc con la subunidad reguladora provoca la liberación de la unidad catalítica, que actúa sobre el ADN y produce efectos a largo plazo sobre el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular.

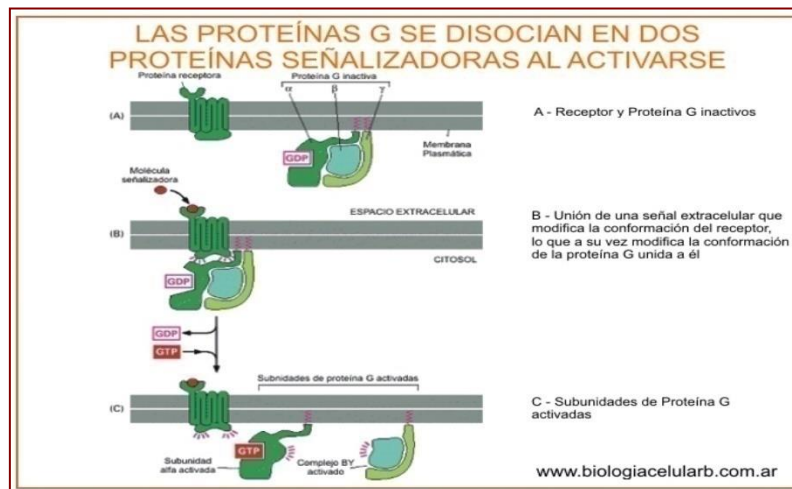


Ilustración 8. Esquema del modo de acción de los receptores acoplados a proteína G.

Diversos estudios farmacológicos, han propuesto la existencia de, al menos, tres tipos diferentes de receptores de las taquicinas en mamíferos (101).

El primer receptor de neuropéptido se clonó en 1987, cuando Nakanishi S. clonó el receptor de la Sustancia K, receptor afín a la SP; varios años más tarde se clonaron otros receptores de las taquicinas (102).

Por medio de clonación molecular y métodos electrofisiológicos, se han identificado los tres receptores de TK de mamíferos como un subgrupo de la superfamilia de receptores heptahelicoidales asociados a proteína G, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo citoplásmico (103).

Así, se ha determinado la existencia de los receptores NK1, NK2, y NK3 y más recientemente se ha clonado una variante del NK3, referido como NK4. También han sido identificados los genes que codifican los tres receptores (104).

De manera general, las TK se unen a sus receptores específicamente, aunque existe afinidad hacia los otros subtipos de receptores por el reconocimiento del grupo carboxilo del núcleo carboxi terminal de los diferentes neuropéptidos (105). En la tabla 4 se resume la afinidad de las TK a los receptores NK1, NK2 y NK3.

RECEPTOR	TAQUICININA
NK1	SP>NKA>NKB
NK2	NKA>NKB>SP
NK3	NKB>NKA>SP

Tabla 4. Afinidad de las TK a los diferentes receptores NK.

El NK1-R es el mejor caracterizado hasta ahora. Es una glicoproteína de 407 residuos y una masa de 46 KDa. cuyo ligando específico es la SP. Se ha postulado que la alta conservación interespecie de la estructura NK1-R es debida

a la alta necesidad de interactuar con más de un ligando de alta afinidad. Es miembro de la familia de los receptores acoplados a proteína G, y más en concreto con las subunidades alfa de la proteína de Gq y G11 (106)

Tabla 6. Estructura y disposición transmembrana de los receptores NK1, NK2 y NK3. Constan de 407, 398 y 452 residuos de aminoácido, respectivamente; siete dominios transmembrana, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular.

Receptor	Esquema del receptor	Takicininas específicas
NK-1R		
Clásico		SP
Sensible a séptidos		SP, NKA, NPK, NPγ, NKB
Nuevo NK-1R-sensible		SP, NKA, NPK, NPγ
NK-2R		NKA, NPK, NPγ
NK-3R		NKB

Constan de 407, 398 y 452 residuos de aminoácido, respectivamente; siete dominios transmembrana, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular. Se muestran además las TK afines a cada receptor.

Gracias al desarrollo de los antagonistas tanto peptídicos como no peptídicos, se conoce más sobre el sitio unión de la SP al NK1-R. De esta manera, se sabe que los giros extracelulares del segundo y tercer dominio transmembrana están involucrados en esta unión, debido al carácter hidrofílico de la SP.

La SP no sólo activa los receptores NK1, sino también los NK2 y NK3 en diversos tejidos y según diversas condiciones, como la disponibilidad del receptor o bien altas concentraciones del péptido (103). Los antagonistas no peptídicos hidrófobos se unen más profundamente entre los segmentos transmembrana (107).

El gen que codifica el NK1-R ha sido llamado Receptor Tachykinin 1 (TACR1). Mediante RT-PCR, se ha establecido la presencia del gen TACR1 en diferentes tejidos humanos, encontrándose en todos los tejidos evaluados por el estudio. Ya anteriormente se conocía la distribución del NK1-R; así la mayor expresión en el SNC se encuentra a nivel del locus coeruleus, estriado ventral, hipocampo y núcleos amigdalares, y en menor proporción en el cortex cerebral, aunque su distribución es muy amplia en todo el organismo humano, como en las células intersticiales arteriales de Cajal de vasos arteriales (108) islotes celulares de páncreas en ratones (109), sistema inmune (110), tracto gastrointestinal (111), pulmón (112), fibroblastos (113), y en tejido uterino tanto de mujeres embarazadas como de no embarazadas (114).

También se conocen diferentes isoformas del NK1-R; difieren unos de otro en la composición de aminoácidos y en su peso molecular, aunque aún no se han establecido bien las posibles diferencias funcionales.

Hasta día de hoy, se han descrito siete isoformas, la mayoría de ellas en la línea celular linfoblástica humana IM-9 en las que se presentan las isoformas de 16, 33, 58, 78 y 116 kDa (115), mientras que en los linfocitos normales humanos se presenta mayoritariamente la de 58 KDa (116).

Caberloto L. et al. (2003) determinaron diferentes isoformas en cerebro humano; van Ginkel F.W. y Pascual D.W. (1996) y Nakata Y. et al. (1988) observaron isoformas de iguales pesos moleculares en cerebros de ratas.

También se ha descrito la existencia de NK1-R en tejido pancreático tanto tumoral como normal de un peso molecular de 46 kDa (117).

En los últimos años, Muñoz M. et al. han demostrado la presencia de isoformas de los receptores NK1 en líneas celulares tumorales humanas, siendo de 54 kDa para la línea celular de neuroblastoma SKN-BE (2); de 37 y 33-34 kDa en la línea celular de glioma GAMG (118); de 33, 58 y 75 kDa en las líneas de retinoblastoma WERI-Rb-1 e Y-79 y de adenocarcinoma de colon SW-403 (2) de 34, 46, 58 y 75 kDa en la línea de cáncer de laringe HEp-2 (119) y en la línea de adenocarcinoma gástrico 23132/37 (120).

Dos variantes naturales del NK1-R, el receptor 407 aa de longitud completa (NK1R-F) que es el objeto del presente estudio y la isoforma 311 aa

denominada truncada (NK1R-T) median las acciones de SP. El truncamiento del receptor altera parcialmente los motivos de señalización de la cola de carboxilo, un sitio crítico para mediar la señalización de NK1-R, dando como resultado un receptor "menos eficiente". Aunque NK1R-F es la isoforma predominante en los sistemas nerviosos central y periférico, NK1R-T se expresa en varios tejidos y células, que incluyen monocitos, células NK y células T. El dominio de unión SP no se ve afectado por el truncamiento y este sitio es idéntico en ambas isoformas del receptor NK1-R. Sin embargo, mientras que las células que expresan NK1R-F responden a concentraciones nanomolares de SP, la activación de monocitos y macrófagos, mediada por NK1R-T, requiere concentraciones micromolares de SP para provocar respuestas de señalización. Los niveles elevados de SP en plasma se asocian con un aumento de las respuestas inflamatorias y los antagonistas de NK1-R reducen la inflamación y la producción de citocinas *in vivo*(59).

La demostración de que además de los NT clásicos como acetilcolina y noradrenalina, pequeños péptidos de 10-40 aminoácidos son también NT a nivel intestinal. Desde que la SP fue descubierta en el intestino como activador de la concentración de músculo liso intestinal, el intestino se ha convertido en un sitio óptimo para estudiar las implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas de la SP.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se ha demostrado consistentemente que los NK1-R y NK3-R se producen en las neuronas entéricas en diferentes regiones y especies (121) siendo los

receptores NK2-R son dominantes en el músculo (122) y que los NK1-R se producen en CIC (123). Las neuronas NK1-R inmunorreactivas son: las neuronas motoras inhibitorias ONS, las neuronas excitatorias del músculo circular colin-acetiltransferasa (ChAT), neuronas secretoras ChAT/neuropéptidoY/somatostatina, neuronas mientéricas ChAT/Calbindina inmunorreactivas, y las neuronas submucosas ChAT inmunorreactivas.

Estos lugares se correlacionan con el papel de los NK1-R en la regulación de la motilidad entérica, la excitabilidad neuronal, y el transporte de agua e iones de la mucosa (124). Las IPANs hacen conexiones sinápticas con otras IPANs donde las TK actúan sobre los NK1-R y NK3-R. También afectan a las neuronas motoras inhibitorias en los NK1-R. Ambos, IPANs y neuronas aferentes primarias espinales, liberan TK en sus terminaciones nerviosas de la mucosa. Esta liberación de TK puede aumentar la secreción de líquido a través de la mucosa y puede contribuir a reacciones inflamatorias al actuar sobre linfocitos y otras células inmunes. Las neuronas motoras actúan a través de NK1-R en las CIC, y en el músculo liso, principalmente a través de los NK2-R.

La excitación del músculo implica su activación indirecta a través de las CIC y a través de efectos directos sobre el músculo. Se ha observado que las CIC expresan NK1-R (125) y además estas células están inervadas por fibras nerviosas TK-inmunorreactivas, sobre todo en los plexos mientéricos profundos(126).

La mayoría de la inmunorreactividad del NK1-R en las CIC está en la superficie celular y las CIC ligan SP, lo que sugiere que los receptores son funcionales (125). En general los NK1-R están ausentes en el músculo, pero se ha observado inmunorreactividad del mismo en el músculo del intestino delgado y grueso en cobayas (127). Las células musculares expresan NK1-R en los seres humanos (128).

Estas células tienen características similares a las células de musculo liso, son contráctiles, contienen actina y se producen en la mucosa. Las células del epitelio intestinal también expresan ambos NK1-R y NK2-R (127) de forma que los RTK pueden mediar efectos secretores y motores en el colon. En las células inmunes intestinales como los linfocitos de la lámina propia y los macrófagos también se expresan los RTK (129) lo que sugiere su participación en la regulación inmunológica y de la respuesta inflamatoria en el intestino (130).

1.7.6 Sustancia P

De los neuropéptidos taquicinérgicos descritos, la SP es quizás la mejor caracterizada y más estudiada en cuanto a su distribución y propiedades biológicas además de las acciones fisiológicas y su implicación en distintas patologías.

El descubrimiento de la SP ocurrió en 1931, cuando Von Euler U.S. y Gaddum J. trataban de encontrar acetilcolina en extractos hipotalámicos e intestinales de caballo. En su lugar, descubrieron una sustancia resistente a la

atropina que producía contracciones del propio intestino y disminuía la presión sanguínea como consecuencia de la dilatación vascular (Von Euler U.S. y Gaddun J.H. 1931). Llamaron SP a este nuevo material, (P de “powder”) ya que observaron que las propiedades de ese nuevo extracto se mantenían cuando se evaporaba a polvo seco en el extracto de los tejidos(94).

No fue caracterizada y aislada hasta 1970, por Chang M.M. y Leeman S.E., que en 1971 identificaron la SP como un undecapéptido (formado por 11 aminoácidos) (131), y en el mismo año Treager G.W. et al. fueron los primeros en sintetizar el compuesto (132). Posteriormente fueron probados en modelos fisiológicos, radioinmunoensayos y estudios inmunohistoquímicos objetivándose la liberación de SP y comprobándose que cumplía los criterios para considerarse un Neurotransmisor.

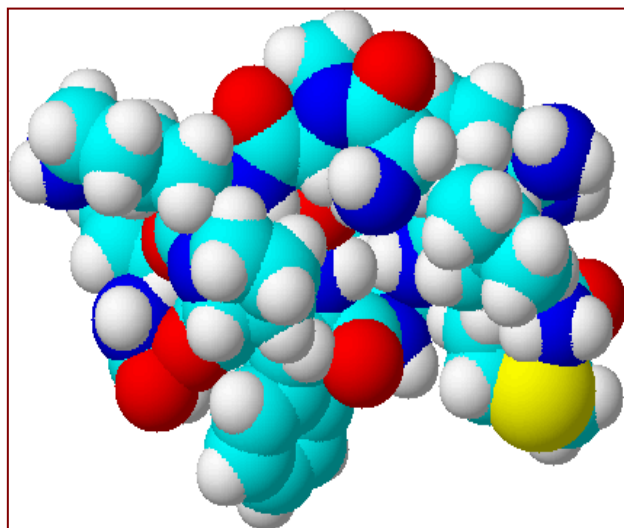


Ilustración 9. Imagen tridimensional de la molécula de SP.

La secuencia de 11 aminoácidos de la SP es la siguiente: **H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH**

El papel neurotransmisor de la SP fue propuesto por primera vez por Lembeck F. en 1953, existiendo varios datos a favor de la acción neurotransmisora de la SP:

- Localización neuronal y concentración preferentemente en los terminales de la región presináptica.
- Transporte desde el cuerpo neuronal hasta los terminales nerviosos.
- Liberación, dependiente de calcio, en respuesta a un estímulo despolarizante adecuado.

El un undecapéptido puro, o sus análogos sintéticos, parecen imitar los efectos mediados por SP. La SP es también considerada neuromoduladora ya que regula la actividad de otros neurotransmisores y como hormona ya que ejerce su actividad a distancia de los lugares donde es liberada.

Estudios moleculares posteriores han demostrado, que la SP ejerce sus actividades biológicas uniéndose a un receptor acoplado a proteína G, el de las neuroquininas con especial afinidad para el NK1-R(130-132).

1.7.6.1 Distribución y localización de la SP

Los datos de la distribución y localización de la SP en el SNC y periférico han sido obtenidos mayoritariamente mediante técnicas de HPLC en

combinación con estudios radioinmunológicos e inmunohistoquímicos (133,134). En este aspecto es interesante destacar la inmurectividad cruzada de los anticuerpos anti SP con otras endokininas similares a SP como la HK-1, EKA, EKB e incluso la virokinina.(135)

La SP se ha encontrado en el sistema nervioso tanto central como periférico de todos los mamíferos con una distribución desigual y grandes concentraciones en algunas áreas mientras que otras se encuentran ausente.

Así, se encuentran grandes concentraciones de SP preferentemente a nivel subcortical en mesencéfalo, hipotálamo y área preóptica, mientras que en el cerebelo es casi indetectable. En la médula espinal humana se localiza mayoritariamente en las astas posteriores.

En el sistema nervioso periférico se localiza principalmente en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios yugular, trigémino y en los nervios vago, ciático y esplénico.

En la mayoría de tejidos y órganos se encuentra ampliamente distribuida localizándose tanto alrededor de los vasos sanguíneos como en terminales nerviosas; presentándose en piel, glándulas sudoríparas, folículos pilosos, pulpa dentaria, aparato respiratorio, genitourinario, cardiovascular y en ambos plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo (134).

En cuanto a la presencia de SP en placenta, Marzioni D. et al. (2005) demostraron por hibridación in situ la expresión en placentas humanas de ARNm

específico para SP, así como la propia SP en tejidos fijados en parafina. Graf A.H. et al (1996) también encontraron SP en las células de la decidua basal placentaria, usando técnicas inmunocitoquímicas. Sastry B.V. et al. (1981) también demostraron la presencia de SP en las vellosidades placentarias mediante radioinmunoensayo, con unas concentraciones medias de 2.4 pg/g de tejido, mientras que Skrabanek P. et al. (1980) no detectaron SP en extractos de tejidos placentarios mediante técnicas inmunorreactivas. Sin embargo, posteriormente, mediante técnicas de inmunohistoquímica se demostró que las células sincitotrofoblásticas expresan SP y NK1-R. Además, la expresión de SP era de predominio nuclear. De otro lado se identificó la expresión de SP y NK1-R en las células de Hofbauer con la misma distribución que en las otras células de la placenta(136,137).

1.7.6.2 Efectos fisiológicos de la SP

La SP es quizás el neurotransmisor más estudiado y al que más acciones fisiológicas se le han atribuido, tanto a nivel del SNC como del resto del organismo. De entre todas ellas, destacaremos:

- Sistema Nervioso Central: existen numerosos estudios dedicados a aclarar el papel de la SP en el SNC, entre ellos se puede resumir:
 - A nivel cortical, la SP actúa como modulador de la actividad neuronal (136,137). En la Sustancia Negra, la SP libera dopamina en interacción con otros neurotransmisores como,

por ejemplo, el GABA. La presencia de SP y de su NK1-R en ciertas áreas como la amígdala sugiere su participación en la respuesta neuroquímica al estrés y en el comportamiento emocional (138,139). Asimismo, la SP está presente en neuronas de la médula espinal, siendo el mayor transmisor de la sensación dolorosa (140), demostrándose que la SP es la que realmente modula y regula la transmisión simpática de las neuronas nociceptivas de la médula espinal (141,142).

- Sistema visual: la SP participa como mediador en la respuesta ocular ante sustancias químicas irritantes, produciendo hiperemia y miosis que provoca de forma secundaria hipertensión ocular(142).
- Cadena ganglionar simpática: según algunos trabajos, la SP formaría parte del arco reflejo no colinérgico intestinal y proporcionaría una conexión funcional entre neuronas simpáticas y sensoriales, dotando a éstas de una funcionalidad, no ser meras transductores de información(143). Otros estudios le proporcionan un papel regulador en la actividad simpática de los ganglios (144).
- Aparato digestivo: el papel de la SP en el tracto gastrointestinal ha sido bastante estudiado (108,146,147). Está implicada en las funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización, función inmunitaria e incluso en la regulación intestinal.

- Sistema circulatorio: a nivel vascular, la SP tiene un potente efecto vasodilatador en humanos, debido a la acción directa en el músculo liso de la pared vascular, estando implicada en la denominada vasodilatación neurogénica; se trataría de neuronas extrínsecas de tipo sensorial las cuales rodean los vasos sanguíneos adyacentes (146).
- Aparato respiratorio: Nilsson G. et al. (1977) detectó inmunorreactividad de SP en el aparato respiratorio, en fibras nerviosas de SP en el músculo, tejido conectivo y epitelio de tráquea. Actualmente, se considera un bronco constrictor, causando además vasodilatación; induce la secreción de moco y regula el mecanismo de aclaramiento mucociliar (112).
- Riñón y Sistema Urinario: la SP funciona como un potente natriurético y diurético, tanto a nivel central como localmente, favoreciendo el flujo sanguíneo renal (134).

1.7.7 Fisiopatología

La SP muestra una amplia distribución en el SNC y periférico, pero también está presente en las células que no pertenecen al sistema nervioso (células del sistema inmunitario, hígado, pulmón, placenta, etc.). La SP se encuentra en casi todos los fluidos corporales como por ejemplo en la sangre, LCR, leche materna etc. Después de su unión al NK1-R regula muchas funciones

fisiopatológicas por eso es probablemente el NT más estudiado y al que más acciones farmacológicas se le han atribuido a nivel del SNC y en el resto del organismo. Además, está implicada en la fisiopatológica de distintas patologías como son la migraña, la depresión, el sueño, trastornos centrales del movimiento, el traumatismo cráneo-encefálico y en enfermedades neurodegenerativas. Fuera del SNC está implicada en distintas patologías en neumología (el asma, la hiperreactividad bronquial, la tos no productiva, infecciones respiratorias, alergias y en la sarcoidosis), en patología infecciosa (cistitis, infecciones virales, VIH, sepsis, meningitis, hepatitis) así como en distintas entidades asociadas a procesos inflamatorios del tracto gastro-intestinal como en la diarrea y en la EII).

Entre las acciones fisiopatológicas más importantes destaca:

1.7.7.1 SP y nocicepción.

Existen numerosos estudios sobre el papel de la SP en la transmisión del dolor. Se sabe que la SP es un modulador de la nocicepción, estando involucrado en la regulación de la excitabilidad de las neuronas nociceptivas del asta dorsal de la médula además de estar involucrada en la integración al dolor, estrés y ansiedad (147). Parece que la SP tiene más que ver con el dolor crónico asociado a la inflamación que con el dolor agudo.

1.7.7.2 SP y depresión.

Según los trabajos de Kramer M.S. et al. (1988), la SP se involucra en desordenes psiquiátricos mediante la regulación de la afectividad emocional y la respuesta neuroquímica al estrés. Se sugiere, por tanto, que alteraciones en la SP o en el NK1-R estarían involucradas en la depresión y/o en otros desordenes psiquiátricos. Trabajos posteriores (147) localizan la SP en el sistema límbico del SNC, áreas relacionadas con el comportamiento emocional (hipotálamo y amígdala).

1.7.7.3 SP y cáncer.

En los años recientes, se ha demostrado que la sobre-expresión de SP/NK1-R, están implicados en la proliferación tumoral (capacidad mitogénica) (148). El NK1-R se ha identificado en células tumorales de astrocitomas, glioblastomas, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastomas (149). También se ha detectado SP en algunos tumores cerebrales primarios (150), sugiriendo la existencia de un sistema autocrino en tumores cerebrales. Además, se ha demostrado in vitro (151) e in vivo (152) que concentraciones fisiológicas de SP y de sustancia K inducen mitogénesis vía NK1-R en la línea celular de astrocitoma humano U373 MG.

Recientemente, el grupo de trabajo del Dr. Muñoz han demostrado la presencia los receptores NK1-R y la capacidad mitogénica de la SP en las líneas

celulares tumorales humanas tanto en el citoplasma como en el núcleo, neuroblastoma SKN-BE (2); glioma GAMG (153); retinoblastoma WERI-Rb-1 e Y-79 (154), cáncer de laringe HEP-2 (155) y adenocarcinoma gástrico y de colon (2).

1.7.7.4 SP y sistema inmune.

Diferentes líneas de investigación indican que, la SP tiene un papel importante en la respuesta inmune, tanto en tejidos periféricos como en el SNC. El balance entre neuropéptidos proinflamatorios y antiinflamatorios resulta crucial, de forma que la ruptura entre este delicado equilibrio jugaría un papel relevante en la patogénesis de enfermedades crónicas y autoinmunes. El sistema receptor NK-1/SP regula los sistemas inmune clásico celular (158,159) y humoral (157), pudiendo estimular la proliferación de células T (158), la diferenciación de células B, degranulación de los mastocitos, y estimular la diapédesis de los leucocitos (113,162,163). La regulación de la función de las células inmune por la SP podría originarse no sólo de fuentes neuronales (nervios sensoriales e inflamación neurogénica) sino también de elementos no neuronales como eosinófilos y macrófagos; además, la expresión tanto de la SP como NK1-R están aumentados durante la inflamación (160). Así mismo, en placentas afectadas por preeclampsia, existe una mayor expresión del gen TAC 1 debido principalmente a la invasión de células del sistema inmune (161).

Cada vez existen más evidencias que apoyan la existencia de una comunicación activa y bidireccional entre SNC y el sistema inmune. De esta manera se acepta que el SNC puede estimular o inhibir la actividad de la inmunidad tanto la innata como la adquirida. El complejo SP/NK1-R se considera el principal mediador en la interacción recíproca existente ambos.

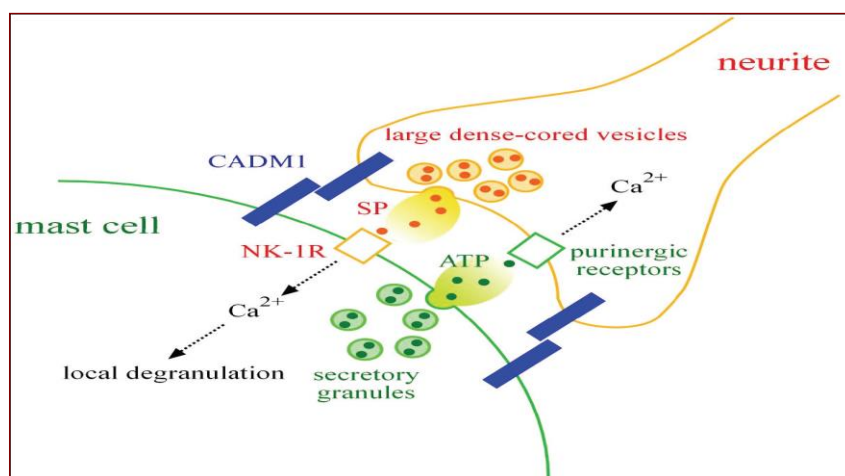


Ilustración 10. Representación esquemática del mecanismo molecular en la comunicación entre células nerviosas y mastocitos

1.7.7.5 SP e inflamación.

La SP está implicada en la inflamación neurogénica produciendo vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación de plasma e infiltración granulocítica (100,157). La liberación de SP inducida por mediadores de la inflamación amplifica la respuesta inflamatoria (100,108). Además de su origen neurogénico, se ha demostrado que los macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células dendríticas también producen SP (155,158-160).

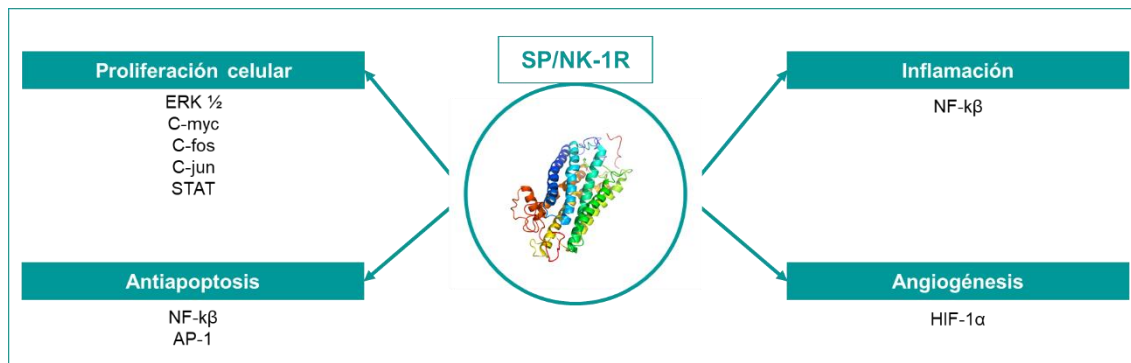


Ilustración 12. Papel y vías de señalización de la SP/NK-1R a nivel nuclear tanto en la inflamación como en la progresión, angiogénesis y migración tumoral.

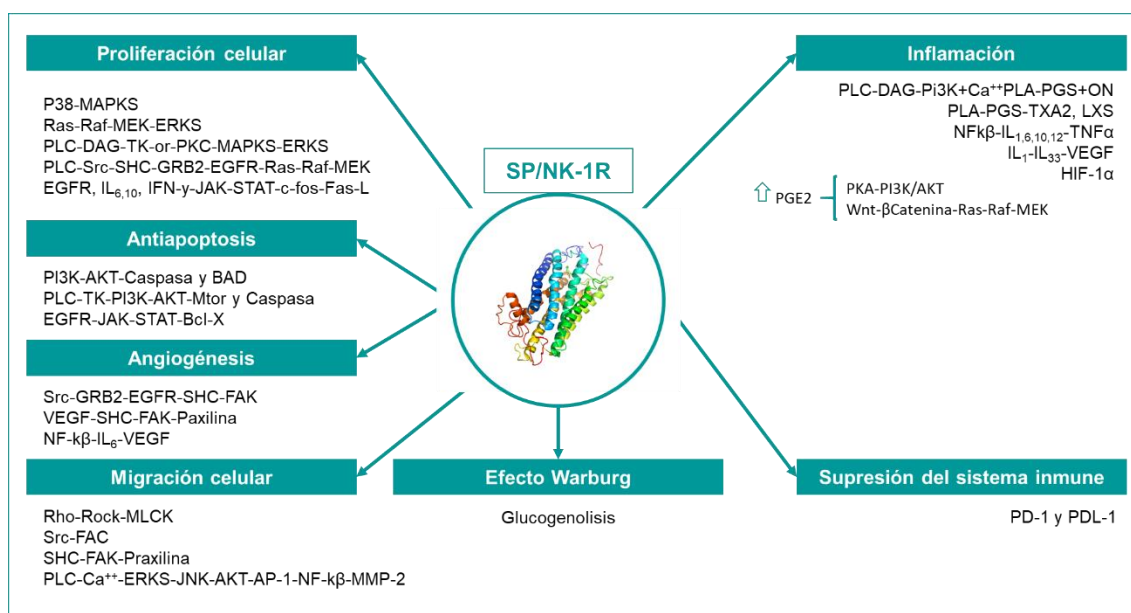


Ilustración 13. Papel y vías de señalización de la SP/NK-1R a nivel citoplásmico tanto en la inflamación como en la progresión, angiogénesis y migración tumoral.

La revisión realizada por O'Connor T.M. et al. (2004) correlaciona elevados niveles de SP en sangre y aumento de expresión de los NK1-R en enfermedades inflamatorias como asma, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis y artritis reumatoide.

1.7.7.6 SP y neoangiogénesis.

Un proceso característico de la inflamación es la neoangiogénesis; creación de nuevos vasos capilares y crecimiento de éstos a partir del sistema vascular preexistente con el consecuente incremento de flujo sanguíneo.

Existen varios estudios en los que se ha relacionado la SP con la neoangiogénesis tanto in vivo como in vitro. (113) describieron cómo la SP estimula la neovascularización in vivo, probablemente a través de inducir la proliferación de células endoteliales mientras que antagonistas específicos de la SP bloquean esta respuesta en córnea de conejo. Fan T.P. et al. (1993) confirmaron la acción proangiogénica de la SP y mostraron también su inhibición por antagonistas del NK1-R en rata. Walsh D.A. et al. (1996), utilizando un modelo experimental en ratas, puso también de manifiesto que la SP aumenta la angiogénesis por una acción directa mediada por NK1-R en la microvascularización, siendo un proceso esencial en la cura de heridas y en la inflamación.

Por otra parte, experimentos in vivo han mostrado que la SP endógena podría estar implicada en la neoangiogénesis relacionada con la inflamación

neurogénica (168) Además, la neoangiogénesis se ha relacionado con el incremento de la expresión de receptores NK1 (169)

La neoangiogénesis, es un sello distintivo del desarrollo de tumores y se ha asociado con un aumento en la invasión del tejido y la expresión de los NK1-R. Se sabe que los análogos de los antagonistas de la SP, sinónimo de antagonistas de los NK1-R, bloquean la acción proliferativa endotelial de la SP, y que ejercen actividad antitumoral.

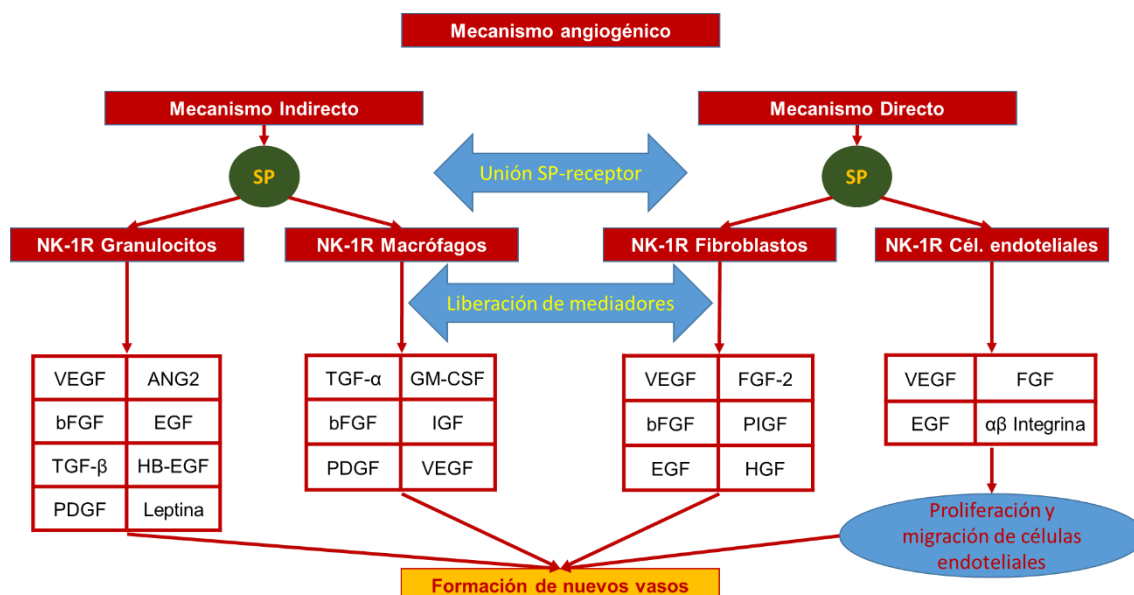


Ilustración 14. Mecanismos de angiogénesis a través del complejo SP/NK-1R.

1.7.7.7 SP y aparato digestivo

El papel de la SP en el TGI ha sido bastante estudiado (140,171). Los tres tipos de RTK se expresan en las neuronas entéricas, músculo liso, células epiteliales, células del sistema inmune y vasos sanguíneos. Tanto la SP como otras TK están implicadas en las funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización, función inmunitaria e incluso se habla de la regulación taquicinérgica intestinal y del potencial papel de los RTK como dianas terapéuticas.

El complejo SP/NK1-R representa un importante circuito inmunorregulador implicado en varias respuestas intestinales fisiológicas y fisiopatológicas y en estados de enfermedad. El sistema nervioso periférico del tracto gastro-intestinal es la única parte del sistema nervioso periférico intrínsecamente capaz de mediar actividad refleja (87). La SP se expresa en los plexos mientérico y submucoso, en las raíces de los ganglios dorsales y en neuronas intrínsecas y extrínsecas (170).

Después del SNC el intestino es la localización con una concentración más alta de SP y frecuentemente se utiliza como modelo para mostrar las propiedades inmunomoduladores de la misma (129).

La SP es fundamental para mantener la contractilidad intestinal y tanto ella como el NK1-R parecen estar implicados en la transmisión muscular intestinal (172,173).

También se ha demostrado el papel de la SP en la diarrea y la inflamación inducida por la toxina A *Clostridium difficile* (174,175) y en la fisiología de otros modelos animales como la infección por *Salmonella* (176,177) e infecciones por parásitos intestinales(78,178).

También la SP, a través del NK1-R, posee efectos anti-apoptóticos en la mucosa del colon mediante la activación de Akt o proteinkinasa B (molécula antiapoptótica), lo que impide la apoptosis y media de recuperación de tejido durante la colitis (175).

En una reciente revisión se muestra la importancia de la SP y el NK1-R en la modulación de las cascadas de la inflamación de la mucosa durante la terapia citotóxica en pacientes oncológicos (176).

También en la señalización sensorial y nocicepción secundaria a la distensión intestinal se ha visto implicada la liberación central de la SP. Por otro lado, estudios en ratones han demostrado que el NK1-R regula la actividad fibrinolítica peritoneal y la formación de adherencias postoperatorias.

Por último, también se sabe que la SP ejerce un efecto trófico durante el período embrionario. Así, DeFelipe, Pinnock & Hunt evidenciaron la implicación de la SP y el NK1-R en el desarrollo de la médula espinal durante la embriogénesis (177). Kovska y colaboradores demuestran un incremento sustancial en la liberación de SP y péptido intestinal vasoactivo (VIP) durante el

proceso de maduración postnatal de la mucosa intestinal en crías de cerdos actuando dichos neuropéptidos como inmunomoduladores endógenos (178).

El mecanismo de participación del complejo SP/NK1-R en la inflamación intestinal implica la sobrerregulación y la activación de NF- κ B en las células diana, que estimula las vías inflamatorias a través de la producción de las citoquinas proinflamatorias en el TGI incluyendo la IL-1, IL-6, IL-8, y el TNF- α (179). La activación de NF- κ B inducida por la SP puede ser independiente o dependiente de la activación de las protein kinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Evidencias recientes indican también que la SP induce en los enterocitos humanos la fosforilación de la protein kinasa C (PKC) δ implicada funcionalmente en la activación de NF- κ B (180). Además, la SP estimula la expresión de la COX-2 y la PGE-2 en células epiteliales de colon humano (180). A la inversa, las citoquinas proinflamatorias regulan la expresión de los NK1-R (181).

En la enfermedad inflamatoria crónica intestinal , enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) además de la evidencia indirecta de estudios en humanos, los resultados de los modelos animales sugieren con fuerza el papel funcional de la SP y sus receptores en la fisiopatología de la misma (127,186) así como la eficacia de los antagonistas del NK1-R como opción terapéutica (182).

Los principales efectos inducidos por la SP en la señalización neuro inmune sobre la inflamación y reparación intestinal en la EII. La SP se libera en diversas áreas del intestino, incluyendo, los plexos mientérico y submucoso. Una vez liberada la SP se une al NK1-R en las células epiteliales del colon que activan tanto las vías proinflamatorias como las de reparación y proliferación tisular. La SP puede activar la PKC δ , causando la activación del sistema de NF- κ B con el consiguiente aumento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias por las células epiteliales y la lámina propia, tales como IL-8 que atraen neutrófilos y causan infiltración. Al mismo tiempo, SP también puede activar vías importantes en la reparación tisular mediante la unión a NK1-R, induciendo metaloproteinasas de la matriz (MMP) que causan la liberación de TGF α , que posteriormente se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico activando la vía que lleva a la proliferación celular y la reparación de los tejidos. En la EII existe una sobre-regulación de NK1-R, así como de citocinas proinflamatorias.

Se conoce que los niveles plasmáticos de SP en los individuos infectados con VIH están aumentados(183,184), que el tratamiento con SP de los monocitos derivados de macrófagos promueve la infección por el VIH, y que el tratamiento con antagonistas de NK1-R inhibe la infección por este virus(185,186). En ensayos clínicos en humanos, el tratamiento durante 2 semanas con antagonistas del NK1-R (APREPITANT®) da lugar a una disminución de varios marcadores proinflamatorios como: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la proteína inflamatoria de macrófagos 1- α (MIP-1 α), el factor estimulante de

colonias de granulocitos (G-CSF), las interleukinas 6 y 8 (IL-6, IL-8, respectivamente) y del receptor de complejos de hemoglobina-haptoglobina de los macrófagos (CD163); en comparación con los grupos tratados con placebo(187).

La sepsis es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica intensa generalmente causada por una infección bacteriana(188,189) . Se ha demostrado que la SP es un neuropéptido inmunorregulador implicado en diversas enfermedades inflamatorias, incluida la sepsis. Previamente se había demostrado que los ratones *knock-out* para el gen de la PPT-A estaban protegidos contra sepsis polimicrobiana de manera significativa(190) ; y que el tratamiento con antagonistas del NK1-R fue beneficioso contra la lesión pulmonar en un modelo de sepsis en ratón(191). El mecanismo por el cual el bloqueo de NK1-R protege contra la lesión pulmonar aún no se ha dilucidado.

Los datos disponibles permiten hipotetizar que la SP a través de NK-1R inicia una cascada de señalización mediada por proteína-quinasa alfa (PK α) que conduce a la activación del factor nuclear de cadenas kappa ligeras-potenciador de las células B activadas (NF- κ B) y de la proteína activadora 1 (AP-1); y modula adicionalmente los mediadores proinflamatorios en la sepsis polimicrobiana. Este efecto de la SP es bloqueado 8 horas después administración del antagonista de NK1-R SR140333 (186). De acuerdo con estos resultados, Hedge et al. demostraron en un estudio *in vivo* que el tratamiento de ratones sépticos con antagonista de NK1-R redujo la degradación de I κ B y la actividad

nuclear del factor nuclear-kappaB (NF-κB) (192). Además, el tratamiento con SR140333 en la sepsis redujo la actividad de otro factor de transcripción, AP-1, que regula varios genes de citoquinas y quimiocinas (192). Por lo tanto, SR140333 parece modular los mediadores inflamatorios regulando la activación de NF-κB y AP-1 (192).

La SP está implicada en la proliferación y migración de diferentes tipos celulares y en diferentes organismos, siendo un efecto muy conservado a lo largo de la evolución. En este sentido, también está implicada en la proliferación y migración de las células tumorales y el uso de antagonistas de la SP están siendo investigados por su potencial terapéutico en el cáncer ya que disminuyen el crecimiento y el desarrollo de metástasis en diferentes líneas celulares de cáncer.

1.7.7.8 Antagonistas.

El desarrollo de los antagonistas de la SP, ha permitido comprender mejor su fisiología, así como la fisiopatología del NK1-R. Se han desarrollado pequeñas moléculas antagonistas del NK1-R tanto peptídicas como no peptídicas y más o menos selectivas permitiendo nuevos avances en el uso terapéutico de estos agentes (193). Hasta el desarrollo del primer antagonista no peptídico (194), surgieron muchos antagonistas de naturaleza peptídica; sin embargo, su baja eficacia, hizo que las investigaciones se dirigieran más hacia las moléculas de

naturaleza no peptídica, las cuales son muchas y con un amplio rango de usos terapéuticos (198,200).

Podemos hablar de más de trescientos compuestos de diferente naturaleza (193). Estos antagonistas producen analgesia (195), tienen efectos antidepresivos (196), ansiolíticos (197), antieméticos (198), y antitumorales(148,204,205) demuestran que el L-733,060, puede ser un buen antiinflamatorio y protector hepático que reduce la inflamación, edema, infiltración neutrofílica, apoptosis y necrosis del hepatocito en un modelo de inflamación hepática en ratón.

Hasta el desarrollo del primer antagonista no peptídico, surgieron muchos antagonistas de naturaleza peptídica, sin embargo, su baja eficacia, hizo que sus investigaciones se dirigieran hacia análogos no peptídicos más potentes y más selectivos los cuales son muchos y con un amplio rango de usos terapéuticos. Aunque hay más de 300 antagonistas de los NK1-R el APREPITANT® , el FOSAPREPITANT® y ROLAPITAN ® son los algunos antagonistas de los NK1-R disponibles para uso clínico(199). Estos antagonistas están indicados para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia.

Los sitios de la unión para los antagonistas no peptídicos de los NK1-R, SP y antagonistas peptídicos de los NK1-R son diferentes y actúan de una manera dependiente de la concentración y su actividad está ligada a las características estereoquímicas, es decir a su afinidad por el NK1-R. Después

de la unión, los antagonistas bloquean las funciones fisiológicas mediadas por la SP y, por tanto, podrían ser utilizados como diana terapéutica en patologías humanas en las que el sistema SP/NK1-R está implicado y sobre expresado.

La administración de estos fármacos se deben esperar menos efectos secundarios a diferencia de los citostáticos, actúan de forma específica en la diana sobre expresada. Además, no tienen ningún efecto y solo actúan sobre los sistemas alterados con el aumento en la liberación de péptidos.

Ventajas y Beneficios	Eventos adversos
Dosis bajas (concentraciones a nivel μM)	Cefaleas
Disminución del crecimiento celular (inhibición de la mitosis celular)	Hipo
Recuperación de la senescencia-apoptosis	Vértigo
Bloqueo de la migración celular: metástasis e invasión	Somnolencia
Bloqueo de la neoangiogénesis	
Sinergia con tratamientos QT y RT	
Mejora de la quimiosensibilización con cisplatino	
Disminución de las dosis de QT y RT	
Antiemético y antinauseoso	
Antidepresivo	
Neuroprotector	
Hepatoprotector	
Nefroprotector	
Cardioprotector	
Antiinflamatorio	
Protector celular (células normales)	

Ilustración 15. Ventajas, beneficios y eventos adversos asociados al tratamiento con antagonistas de NK-1R.

Muchos ensayos clínicos han informado de la ausencia de efectos secundarios graves con la administración de antagonistas de los NK1-R en seres humanos, incluso cuando el antagonista se administró a dosis altas (300 mg/día). Así pues, están surgiendo nuevas líneas de investigación para mejorar el tratamiento de enfermedades en las que el sistema SP/ NK1-R está regulado positivamente.

Como antitumorales, de acuerdo con los datos obtenidos en los estudios preclínicos el uso de antagonistas en terapia oncológica es bastante prometedor pues inducen la apoptosis en las células tumorales con inhibición en la actividad migratoria y ejercen propiedades anti angiogénicas.

1.8 JUSTIFICACIÓN Y PERTINENCIA

La investigación en el CCR que es la segunda causa de muerte por cáncer en Andalucía justifica la pertinencia de este trabajo que pudiera derivar en una intervención sanitaria en este tipo de neoplasias. El abordaje de este problema de salud requiere una actuación multidisciplinar que implica el trabajo en equipo de médicos de familia, digestólogos, radiólogos, patólogos, oncólogos clínicos, radioterapeutas, enfermeros, farmacéuticos y especialistas en medicina nuclear (4).

Las pruebas existentes para predecir el riesgo de recurrencia del cáncer y los genes implicados en el crecimiento y la diseminación de tumores no

incluyen en la actualidad al binomio SP/ NK1-R. La incorporación de este nuevo parámetro puede ayudar a médicos y a los pacientes en el conocimiento de la fisiopatología, en el manejo clínico-terapéutico identificando a las personas con riesgo más bajo de recurrencia a evitar los efectos secundarios del tratamiento adicional.

La inmunoterapia también llamada terapia biológica, está diseñada para estimular las defensas naturales del cuerpo a fin de combatir el cáncer. Utiliza materiales producidos por el cuerpo o fabricados en un laboratorio para mejorar, dirigir o restaurar la función del sistema inmunitario. En los últimos años, los investigadores han descubierto una clase de fármacos que actúan en el modo en que las células tumorales evitan el sistema inmunitario. Estos fármacos se denominan inhibidores de puntos de control.

Las últimas investigaciones han demostrado que ciertos inhibidores de puntos de control, llamados inhibidores de PD-1 o PD-L1, pueden ser efectivos contra un tipo de CCR metastásico con niveles elevados de microsatélites (*Microsatellite High*, MSI-H) este hecho justifica la pertinencia de incluir en nuestro trabajo este parámetro. Recientemente la FDA aprobó el pembrolizumab para tumores que son MSI-H. Existen ensayos clínicos en curso que buscan combinar inhibidores de puntos de control con otros fármacos o tratamientos dirigidos al cáncer para saber si pueden ser útiles en tumores que no son MSI-H.

La existencia de nuevos medicamentos que actualmente que actualmente son evaluados para el tratamiento del CCR, incluidos el cáncer de colon y el cáncer de recto en etapa avanzada. Se estudian nuevos tipos de quimioterapia y terapia dirigida. La mayoría se encuentra disponible únicamente a través de ensayos clínicos.

El trabajo aquí expuesto es fruto de un cúmulo de circunstancias a lo largo del tiempo que, poco a poco, me han dirigido hacia el tema del CCR como importante problema de salud al que nos hemos de enfrentar los médicos diariamente y a mi participación quincenal en la Comisión de tumores digestivos donde desarrollo mi actividad asistencial en el Hospital San Juan de Dios del Aljarafe. El hecho de que sea una patología muy frecuente en la mayoría de los países del mundo occidental, la discusión abierta sobre la necesidad o no de instaurar programas de cribado a nivel poblacional como es el test de SOH que actualmente está instaurándose en un grupo de edad en nuestro área de Salud y que espero reporte beneficios en el paciente y cuál sería el método más válido y los diferentes estudios de prevención primaria con resultados controvertidos son temas que, desde hace tiempo, han atraído mi atención de forma especial.

***HIPÓTESIS/
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN***

El CCR es el tipo de cáncer más frecuente diagnosticado en España en ambos sexos en 2017 (5). Las causas del CCR son desconocidas, aunque se habla de antecedentes étnicos y raciales, así como factores relacionados con la edad, la obesidad, la alimentación, el tabaco, la inactividad física y el alcohol.

La compleja fisiopatología de las neoplasias, su relación con mediadores de la inflamación y el papel de la SP / NK1-R tanto en procesos inflamatorios como en la progresión y metástasis de las neoplasias malignas. Nos ha llevado a plantearnos este estudio en el que tratamos de demostrar mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica la expresión de tanto la SP y el NK1-R, en las células de neoplásicas del CCR.

Hasta el momento existen pocos estudios de la expresión de SP/NK1-R adenocarcinoma de colon y, aunque existen trabajos que demuestran la expresión y distribución en el colon y de animales, así como en otros tumores de diferentes localizaciones nos proponemos realizar una evaluación semicuantitativa de la expresión de este undecapéptido y de su receptor en tejido colorrectal procedente de biopsias conservadas en el Archivo de General de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe.

1.10 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Se expresa la SP y los receptores NK1-R en el tejido normal y neoplásico colorrectal?
2. ¿Cómo se distribuyen y con qué intensidad se expresan estos marcadores en el tejido normal y en el CCR?
3. ¿Qué relación tiene la SP/NK1-R con las variables clínicas, histológicas y biomarcadores moleculares relacionados con el CCR?
4. ¿Qué relación tiene la SP / NK1-R con la supervivencia libre de enfermedad y global específica del CCR?
5. ¿Aumenta la expresión de SP / NK1-R en el CCR el riesgo de recurrencia (recidiva local y /o metástasis) y mortalidad asociada al CCR?

1.11 HIPÓTESIS

1. La expresión inmunohistoquímica (IHQ) de SP/NK-1R medida con la escala de Allred es superior en las células tumorales del CCR que en el tejido colorrectal normal.
2. La expresión inmunohistoquímica (IHQ) de SP/NK-1R en el CCR se asocia a un aumento del riesgo de recurrencia (recidiva local y/o metástasis a distancia) y de mortalidad asociada a la citada neoplasia.

3. La expresión IHQ de SP/NK1-R se asocia con las variables histopatológicas, clínicas y moleculares estudiadas.
4. Se puede incorporar el binomio SP/NK1-R como probable biomarcador diagnóstico y terapéutico para el uso de antagonistas específicos para NK1-R.

OBJETIVOS

1.13 OBJETIVOS

1.13.1 General

Estudiar mediante técnicas IHQ la expresión, localización y distribución de SP/ NK-1R en el CCR y en el tejido colónico normal y su relación con la progresión del CCR.

1.13.2 Específicos

- 1) Describir y comparar la expresión de la SP y el NK1R en el tejido colorrectal normal y tumoral.
- 2) Estudiar el conjunto heterogéneo de variables (histológicas, bioquímicas y biomoleculares) que pueden influir en la mortalidad y recurrencia de forma independiente en los pacientes con CCR.
- 3) Identificar los factores (histológicos, bioquímicos y biomoleculares) asociados a la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global específica del CCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO

Estudio de cohortes retrospectivas mediante estudio anatómico-morfológico semicuantitativo de la expresión y distribución de la SP y su NK1-R con técnicas inmunohistoquímicas y análisis de datos clínicos con seguimiento de los casos desde el año del diagnóstico (2009) hasta junio de 2018 o hasta fecha de exitus.

3.2 ÁMBITO

Pacientes pertenecientes al Área dependiente del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe (Bormujos, Sevilla) (HSJDA).

3.3 PERIODO DE ESTUDIO

Se analizaron piezas quirúrgicas del periodo 01/01/2009 al 31/12/2009 y se siguieron y analizaron los parámetros de estudio hasta el 30 /06/2018.

3.4 POBLACIÓN

Todas las muestras analizadas en este proyecto pertenecen a casos custodiados en el archivo general de Anatomía Patológica del HSJDA (Hospital San Juan de Dios del Aljarafe) procedentes de piezas quirúrgicas del periodo de

estudio señalado arriba. Se eligieron muestras de este periodo con el fin de poder usar el material residual de los bloques de parafina sin entrar en riesgo de que se solicitaran nuevas evaluaciones de las piezas por revisión de la terapia y para tener un periodo de seguimiento de 10 años tras la biopsia. Con todo ello se ha tenido la precaución de seleccionar biopsias que tuvieran múltiples bloques, y de no agotar aquellos bloques de parafina de los que se han obtenido los cilindros de tejido para la realización de este estudio.

3.4.1 Criterios de selección

3.4.1.1 *Criterios de inclusión*

Casos aleatorios de piezas de recto-sigmoidectomías con diagnóstico histológico de adenocarcinoma colorrectal teniendo en cuenta las siguientes observaciones:

- Material histológico en buen estado de conservación y sin artefactos en su procesamiento. Comprobado antes sobre el bloque seleccionado y mediante tinción con hematoxilina-eosina (H-E), técnica de rutina en el diagnóstico anatomopatológico de este tipo de muestras.
- Que quede tejido remanente tanto normal como patológico tanto en el bloque seleccionado como en otros bloques del mismo paciente por si fuera necesario completar estudios moleculares. en especial en:

- Casos de carcinoma colorrectal metastásico y en adenocarcinomas sobre adenomas serrados en los que según protocolo se realiza estudio mutacional de RAS/ BRAF.
- Casos con criterios de Bethesda para cáncer colorrectal hereditario; con criterios de Ámsterdam II de cáncer colorrectal hereditario.
- Estadios IIA y IIB donde estaría indicado el estudio inmunohistoquímico de proteínas del sistema de reparación del ADN (MMR).
- Casos con pérdida de expresión de alguna de las proteínas MMR; casos con criterios de Ámsterdam de carcinoma colorrectal hereditario donde estaría indicado estudio molecular de la inestabilidad de microsatélites.

3.4.1.2 Criterios de exclusión

- Pieza con alto riesgo de agotamiento del bloque de biopsia como adenocarcinomas sobre pólipos.
- Piezas de recto-sigma radiadas in carcinoma residual en remisión completa.

3.4.2 Muestra

3.4.2.1 *Tamaño muestral*

Se calculó el tamaño muestral mediante la herramienta estadístico-epidemiológica EPIDAT 4.1.

En el periodo de estudio se realizaron unas 166 resecciones de colorrectales por adenocarcinoma de tipo intestinal. Por estudios previos en otros tumores, se ha determinado que la proporción de muestras con puntuación igual o superior a 5 (expresión intermedia a fuerte) en la escala de Allred de expresión de la SP a nivel nuclear es del 11.5% en el tejido normal (estroma) y del 55.7% en el tejido tumoral. Aceptando un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90%, el tamaño muestral necesario sería de 54 casos (27 de tejido normal y 27 de tejido tumoral). El mismo número de casos se utilizaría para la tinción con anticuerpos frente a NK1-R, ya que las proporciones de expresión a nivel citoplásmico de este receptor son de 3.8% en el tejido normal y de 88.4% en el tejido tumoral; y por tanto la muestra necesaria sería menor para encontrar diferencias con significación estadística. Por todo ello, se ha decidido tomar un tamaño de muestra de 58 casos con el fin de cubrir pérdidas.

3.4.2.2 Técnica de muestreo

Se hará un muestreo aleatorio simple mediante una tabla de números aleatorios. Se aplicó la aleatorización a todos los casos de adenocarcinoma de colon extirpados en el periodo de estudio.

3.5 VARIABLES DE ESTUDIO

3.5.1 Dependientes

Hemos definido como variables dependientes el nivel de expresión y distribución de la SP y su NK1-R; exitus, supervivencia, recidiva y metástasis.

3.5.2 Independientes

Entre estas variables hemos analizado la edad, el sexo, el diagnóstico histológico, el estadio TNM, los valores del Antígeno Carcinoembrionario (CEA), inflamación peritumoral, invasión perineural y expresión de K-Ras nativo, entre otras - ver tabla de variables (Anexo II).

3.6 FUENTES DE DATOS

Las muestras biológicas proceden del archivo general de Anatomía Patológica del HSJDA.

Los datos clínicos se han extraído de las historias clínicas digitales registradas en las siguientes bases de datos: DIRAYA de Atención Primaria, Estación Clínica de Atención Hospitalaria (Hospital Virgen del Rocío) ambas del Servicio Andaluz de Salud y TiCares (Historia Digital del HSJDA), bases de datos de los laboratorios clínicos del HSJDA y HVR (para la evaluación de los niveles de antígeno carcinoembrionario, CEA), y base de datos (servolab) de informes de la sección de Anatomía Patológica del HSJDA.

3.7 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.7.1 Preparación de muestras y realización de los cortes



Ilustración 16. Aparato de inclusión automatizada.

Una vez seleccionados los casos que cumplieron los criterios de inclusión se localizaron los bloques de parafina que incluían el material histológico a estudiar. Este material histológico procede de recto-sigmoidectomías que se procesaron según el protocolo habitual del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe. Las piezas de biopsia fueron fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina

tras inclusión automatizada (ver ilustración 15).

Una vez obtenidos los bloques se realizaron cortes de 5 μm con un micrótomos RM2255 (Leica®) a un grosor de 4 μm y se montaron en portaobjetos destinados para inmunohistoquímica (xilanizados y en periodo de uso). Los cristales se identificaron mediante serie numerada correspondientes al número de identificación univoco asignado a la muestra quirúrgica en el proceso de solicitud telemático de estudio de biopsias dentro de la sección del Laboratorio en el módulo de Anatomía Patológica.

3.7.2 Construcción de una matriz de tejidos (Tissue Micro Arrays. Tma)



Ilustración 17. Imágen de slide TMA COLON.

Los bloques de parafina de los casos seleccionados se remitieron al Nodo del Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío– Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) para su procesamiento inmunohistoquímico.

El estudio se inicia con la realización de los cortes en un micrótomos RM2255 (Leica®) a un grosor de 4 μm y los portaobjetos se tiñeron con H-E, para realizar la selección de las zonas de tejido a incluir en la matriz de tejido (TMA). Se

seleccionaron áreas representativas y se extrajeron cilindros de tejido de 1 mm de diámetro y al menos 2 mm de profundidad. Estos cilindros fueron posteriormente colocados de manera ordenada en un nuevo bloque de parafina utilizando el Manual Tissue Arrayer-1 (MTA-1, Beecher Instruments®). El bloque resultante es una matriz que contiene 60 cilindros de 1 mm de diámetro provenientes de los distintos casos (cada uno representado por duplicado) y separados entre sí por 0.8 mm de distancia. Se cortaron secciones en portaobjetos del TMA en un micrótopo a 4 µm para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas y se montaron en portaobjetos destinados para inmunohistoquímica (xilanizados y en periodo de uso).

3.7.3 Método IHQ

La inmunotinción basada en el uso de estreptavidina-biotina y revelado con DAB, siguiendo las recomendaciones de las fichas técnicas de los anticuerpos se realizó de forma automatizada, utilizando el inmunoteñidor Benchmark XT® de Roche diagnostics®. De forma resumida, el procedimiento realizado fue el siguiente:

La aplicación de esta técnica requiere la desparafinación y rehidratación de las muestras. Para la desparafinación, los portaobjetos con los cortes de parafina, se sumergieron en dos baños sucesivos con Xilol durante 10-15 minutos cada uno. Posteriormente, se rehidrataron mediante inmersión en

alcoholes de concentración decreciente durante 10 minutos cada uno (100%, 90%, 80%, 70%) y, por último, se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

A continuación, se realizó un pretratamiento para recuperación antigénica, de acuerdo con las recomendaciones indicadas en las fichas técnicas.

Una vez realizado este paso, se procedió a bloquear la actividad de la peroxidasa endógena presente en las muestras, sumergiéndolas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos. Posteriormente, para evitar el background o tinción inespecífica de fondo en una solución de bloqueo (Blocking reagent, Roche) al 1% para cubrir los sitios de unión inespecíficos.

Las secciones se incubaron con los anticuerpos anti-SP, 1/1500 y anti-NK1-R, 1/500, durante 1 hora. Después de lavar con tampón, se aplicaron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el sustrato cromogénico 3,3'-diaminobencidina para desarrollar la inmunoreactividad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bond Research Detection System®, Leica).

Posteriormente, se procedió a la contratinción y montaje de las secciones. Los núcleos se tiñeron mediante inmersión durante 1 minuto en Hematoxilina de Harris diluida para, después virar la tinción en una solución de carbonato de litio saturada. Antes de montar las muestras en resina sintética para su observación al microscopio, se deshidrataron mediante inmersión en un batería de alcohóles de concentración creciente hasta llegar al alcohol absoluto, seguido de xilol y

montaje en resina sintética. Las secciones se montaron en DPX (BDH Laboratories®).

En base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se decidió realizar algunas modificaciones para mejorar el protocolo IHQ:

A todas las muestras se les aplicó un pre-tratamiento térmico con tampón EDTA a pH 9.

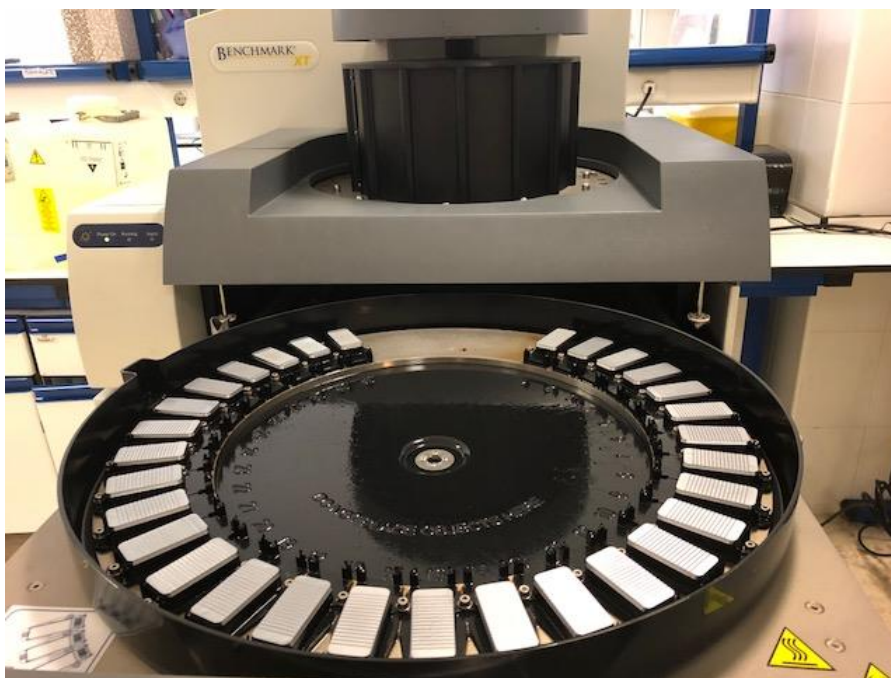


Ilustración 18. Equipo automatizado para IHQ.

Se utilizó un sistema de detección más sensible (Martin-Lacave I; García-Caballero T, 2011) (200). Una vez incubadas las muestras con el anticuerpo primario, después de lavarlas con PBS, se cubren con el sistema de detección se incuban durante 40 minutos en cámara húmeda.

3.7.4 Valoración e interpretación de los resultados

Las muestras fueron valoradas e interpretadas una a una en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe (Bormujos, Sevilla). Para ello, se siguió un sistema ciego de identificación de las muestras en el que no se conoce ningún dato del paciente (edad, diagnóstico anatomopatológico, etc.) en el momento de valorar cada muestra. Para cada uno de los 29 casos y 29 controles de este estudio se valoraron de forma sistemática 8 ítems de la histología colorrectal tanto para las muestras de SP/NK1-R y los controles negativos y positivos. En cada muestra de tejido colorrectal se valoró la intensidad al menos en 10 campos a una magnificación 40x evaluando la extensión de la tinción para cada uno de los elementos histológicos ya definidos, empleando para ello una escala semicuantitativa previamente definida con el siguiente sistema de puntuación (11):

- **Puntuación de extensión:**

Puntuación de Extensión	0	1	2	3	4	5
Proporción de células teñidas	0%	<1%	1%-10%	10%-33%	33%-66%	>66%

- **Puntuación de intensidad:**

Puntuación de Intensidad	0	1	2	3
Intensidad de células teñidas	Nada	Débil	Intermedia	Intensa
Escala colorimétrica		Amarillo claro	Marrón amarillo	Marrón

- **Puntuación global:** se calcula mediante la suma de las puntuaciones conseguidas en extensión e intensidad. Puede tomar los siguientes valores 0 (negativo) y entre 2 y 8 (positivo).

Tras valorar e interpretar la tinción en cada una de las muestras se completó la información con la correspondiente HC para realizar su análisis posterior por estratos. Se obtuvieron fotografías de las muestras más representativas mediante un microscopio Zeiss® Primostar HD, dotado con objetivos de diferentes aumentos (4X, 10X, 20X, 40X, 100X) y acoplado a una cámara fotográfica digital con el software Zen 2.3 lite.

3.7.5 Limitaciones de los instrumentos de medida

Entre las limitaciones en la evaluación de las muestras nos encontramos con que la valoración del grado histológico adolece de tener una alta variabilidad inter-observador que en nuestro caso intentamos evitar mediante la lectura de dos observadores independientes (patólogos de amplia experiencia profesional) y en caso de discordancia será resuelta por un tercer patólogo.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estos los datos se registraron en una hoja de cálculo Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos). Una vez depurados los

datos. Se analizaron mediante el programa estadístico IBM® Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics®) versión 22. Se hizo una exploración de los datos y finalmente se realizó el análisis estadístico propiamente dicho cuya metodología se describe a continuación.

3.8.1 Análisis univariante

El estudio estadístico descriptivo tiene la finalidad de organizar, representar gráficamente, y resumir adecuadamente la información recogida sobre las variables de estudio. La información de tipo cualitativa y la de tipo cuantitativa discreta ha sido organizada y resumida en tablas de frecuencias en las que se ha indicado el número de casos y los porcentajes de cada categoría. La información cuantitativa de tipo continuo se ha organizado en tablas de frecuencias y se ha resumido con medidas estadísticas que nos informan sobre la centralización (medianas) y la dispersión (recorridos intercuartílicos, RIC, que se ha expresado mediante los percentiles 25 y 75) de los datos. Este estudio descriptivo nos ha permitido obtener una buena información sobre las características de nuestra muestra de pacientes.

Se realizó un análisis de cada una de las variables cuyos resultados se expresaron según la naturaleza de cada una de ellas. Así las variables cualitativas se expresaron en número (frecuencias absolutas) y porcentajes, junto a sus intervalos de confianza al 95%; y las variables cuantitativas, cuya distribución fue asimétrica (no normal), se resumieron mediante su mediana

(Med) y el recorrido intercuartílico (RIC). Para determinar la simetría de las distribuciones de las variables cuantitativas utilizamos el test de Kolmogorov-Smirnov.

3.8.2 Análisis bivalente (inferencial)

Su finalidad ha sido la de obtener unas conclusiones científicas, rigurosas, objetivas y válidas, junto con sus niveles de error en términos probabilísticos, sobre la población de pacientes objetivo de investigación. Dentro del contexto general de este estudio inferencial se han realizado los siguientes análisis estadísticos:

- **Análisis para comprobar la posible asociación entre variables categóricas:**

Ha sido realizado con aquellas parejas de variables categóricas en las que se ha tenido interés en detectar una posible relación estadística (asociación). Por ejemplo: estadio histológico y exitus o presencia de metástasis. Tras la determinación de las correspondientes tablas de contingencia, se ha aplicado el test asintótico de la Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher (caso de no verificarse las condiciones de validez exigidas para la correcta aplicación del test asintótico de la Chi-cuadrado). En ambos casos, se ha admitido la asociación entre las correspondientes variables cuando se ha obtenido un p-valor inferior o igual a 0.05.

- **Análisis de asociación entre variable cualitativas y cuantitativas:**

Previamente a estudiar la asociación, se realizó un análisis para comprobar si cada variable cuantitativa considerada en el estudio seguía una distribución normal en cada uno de los subgrupos formados por las variables cualitativas. El objetivo de este estudio fue comprobar si era admisible asumir el modelo Normal de probabilidad. El análisis se efectuó aplicando la prueba de normalidad de Komolgorov-Smirnov. Se consideró la normalidad cuando el p-valor obtenido fue igual o superior a 0.05. En caso de ser demostrada la normalidad es necesario demostrar la homocedestacidad (similitud de varianzas) mediante el test de Levene para aplicar ciertos test, como por ejemplo la T de Student. Hemos de significar que este análisis es necesario como un paso previo a la aplicación de los análisis estadísticos comparativos con objeto de decidir si hemos de utilizar métodos estadísticos paramétricos o no paramétricos. En el caso de nuestras variables no se pudieron aplicar test paramétricos debido a la asimetría de las distribuciones en uno o en ambos de los subgrupos constituidos por las distintas variables cualitativas.

Finalmente se realizó el análisis comparativo de las variables cuantitativas continuas. Para comprobar si existía significación estadística en las diferencias encontradas entre las distribuciones por grupos de estudio se aplicaron los siguientes test no paramétricos para grupos independientes:

- Test U de Mann-Whitney para comparar las distribuciones de una variable cuantitativa continua según una variable categórica dicotómica.
- Test de Kruskal-Wallis cuando la variable cualitativa tenía tres o más categorías.

Para analizar el comportamiento de variables cuantitativas en dos momentos de la evolución utilizamos test no paramétricos de medidas relacionadas o repetidas:

- Test de Wilcoxon cuando comparamos las diferencias de distribución en dos momentos del seguimiento.
- Test de Friedman, para detectar diferencias en una serie temporal (medidas repetidas en más de 2 momentos del seguimiento).

En todos estos análisis, se ha aceptado la existencia de diferencias entre las distintas distribuciones cuando se alcanzó un p-valor inferior o igual a 0.

3.8.3 Análisis de supervivencia

3.8.3.1 Análisis de supervivencia.

El principal objetivo de este análisis ha sido tratar de modelizar la probabilidad de ocurrencia a lo largo del tiempo de los sucesos objetivo de investigación. En concreto, hemos realizado dicho análisis de supervivencia para la ocurrencia, en un periodo de 10 años, de los tres sucesos de interés en esta

investigación, la recurrencia (aparición de recidiva local o metástasis), la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la mortalidad tanto a nivel global (supervivencia global, periodo desde el momento del diagnóstico de la enfermedad) hasta el exitus por cualquier causa, o la mortalidad global específica por el cáncer colorrectal (supervivencia global específica por cáncer, SGEC). Hemos aplicado la metodología clásica no paramétrica de Kaplan-Meier determinando las correspondientes curvas de supervivencia para ambos sucesos.

3.8.4 Análisis multivariante

3.8.4.1 *Análisis de regresión de Cox.*

Intentamos un análisis de supervivencia mediante un modelo de riesgos proporcionales (regresión de Cox). Este análisis estadístico, también conocido con el nombre de análisis de regresión de riesgos proporcionales, es una técnica de carácter multivariante que permite modelizar matemáticamente la relación existente entre el riesgo de ocurrencia de determinado suceso (dicotómico) bajo investigación; en concreto permite modelizar la denominada función de riesgo (*hazard function*) dependiente del tiempo, y las variables independientes (explicativas, predictoras o covariables) con posible influencia en la ocurrencia de dicho suceso. En este estudio se ha realizado este análisis para modelizar las funciones de riesgo correspondientes a los dos sucesos bajo investigación, a saber: la recidiva, metástasis (SLE) y la mortalidad global y la específica por

cáncer colorrectal (SGEC). El análisis se desarrolló en las dos fases que seguidamente describimos:

- En una primera fase, se realizó un análisis estadístico univariante en el que fue valorando, por separado, cada una de las variables incluidas en el estudio con posible relación en la recurrencia (recidiva-metástasis) y en la mortalidad por cáncer. En una segunda fase, las variables asociadas es decir aquellas en las que se obtuvo un p-valor inferior a 0.15 en la primera fase, se incluyeron en el análisis multivariante. Utilizando el método de “pasos hacia adelante” se ajustaron los modelos predictivos para ambos casos, mortalidad específica por cáncer y recurrencia.

Hemos de significar: que en el estudio realizado se descartaron aquellas variables afines que pudieran introducir redundancias en el modelo y aquellas variables cuyos datos no estaban completados en más del 50% de los casos. Y que para el ajuste de los modelos por regresión de Cox se han seguido las recomendaciones establecidas al respecto que permiten validar o actualizar un modelo de predicción, ya sea con fines de diagnóstico o de pronóstico.(201). Seguidamente, se compararon algunas de las curvas de supervivencia a través del método de Kaplan-Meier.

3.9 CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Este proyecto se presentará para la evaluación de los aspectos éticos al Comité de Bioética de la Investigación (CEIC) de los Hospitales Virgen Macarena-Virgen del Rocío, que son nuestros hospitales de referencia. El certificado de aprobación está disponible en el anexo 1.

Estudio sujeto a los principios adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y posteriores revisiones. Se han seguido las normas de Buena Práctica Clínica dictadas por la Conferencia Internacional de Armonización de Directrices sobre Buena Práctica Clínica y los requisitos de las Autoridades Sanitarias Españolas establecidos en el Real Decreto 711/2002 de 19 de Julio.

Los investigadores aseguraron la confidencialidad de los datos y velaron por mantener el anonimato de los pacientes cuyos datos clínicos se incluyeron en el análisis, dando cumplimiento inicialmente a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y posteriormente siguiendo las recomendaciones del REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (Reglamento general de protección de datos). Se trabajará con dos bases de datos (BD). Con esta finalidad se trabajó con dos bases de

datos (BD) que se custodiaron en archivos diferentes. En la BD-1 se relacionó el NId (número de identificación del paciente) con los datos personales, siendo el NId un número unívoco para cada paciente. En la BD-2 se relacionó el NId con los datos clínicos de los pacientes.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se analizaron 58 muestras (29 de tejido normal y 29 de tejido tumoral) procedentes de las piezas de resección de recto-sigma de los pacientes estudiados. La edad media fue de $69,7 \pm 9,4$ años (IC95%: 67,2-72,1) con un mínimo de 50,7 y un máximo de 87,7 años. Del total de casos, 20 (34,5%) eran mujeres.

El diagnóstico histológico de todos los casos estudiados fue adenocarcinoma de tipo intestinal / enteroide siendo el grado de diferenciación moderadamente diferenciado el más frecuente en 24 (82,8%) casos. La invasión del margen quirúrgico en 10 (17,2%) casos, de los que el borde más afectado fue el lateral distal seguido de margen radial. En 22 (37.9%) casos se describió invasión perineural e invasión vascular en 36 (62.1 %). En 12 (20,7 %) casos se detectó invasión de estructuras vecinas.

En el estudio de los ganglios linfáticos determino que se aisló una media de $12,3 \pm 5,9$ (IC95%: 10,8-13,8), con un mínimo de 0 y un máximo de 24. La ratio media (DS) de adenopatías metastásicas respecto del total de ganglios estudiados fue del $13,1 \pm 24,2$ (IC95%: 6,8-19,5). El número de casos en los que se aislaron menos de 12 ganglios (catalogados como resección incompleta) fue

de 24 (41,4 %). La descripción de las variables cuantitativas está en la tabla 7 y las cualitativas en la tabla 8.

El estudio de los ganglios identificados puso de manifiesto que 28 (48,3 %) casos tenían metástasis en los ganglios linfáticos de la pieza quirúrgica.

El tamaño medio de los tumores resecados fue de 4.3 ± 2.1 cm (IC95%: 3,8-4,9) con un mínimo de 1.5 y un máximo de 9 cm.

Tabla 7. Descripción de las variables cuantitativas.

Variable	N	mín	Máx	Mediana (P25 ; P75)
Edad al diagnóstico (años)	58	50,7	87,7	70.0 (63.5 ; 76.4)
Edad al fin de seguimiento (años)	58	54,4	97,0	72,8 (67,2 ; 84,6)
Tiempo hasta fin de seguimiento (meses)	58	5,0	113,0	60,0 (42,0 ; 107,0)
Supervivencia libre de enfermedad (meses)	58	5,0	113,0	45,0 (14,0 ; 106,0)
Supervivencia Global Específica de Cáncer (meses)	58	5,0	113,0	58,5 (39,0 ; 107,0)
Tamaño tumor (cm)	58	1,5	9,0	4,0 (3,0 ; 6,0)
Número de adenopatías extirpadas	58	0,0	24,0	13,0 (8,0 ; 15,0)
Número de adenopatías positivas	58	0,0	17,0	0,0 (0,0 ; 1,0)
Ratio de adenopatías positivas	58	0,0	1,0	0,0 (0,0 ; 0,2)
Intensidad Global SP Citoplasma (Allred)	58	3,0	8,0	5,0 (4,0 ; 5,0)
Intensidad Global SP Núcleo (Allred)	58	0,0	8,0	4,0 (3,0 ; 6,0)
Intensidad Global NK1-R Citoplasma (Allred)	58	2,0	8,0	4,0 (3,0 ; 5,0)

Tabla 8. Descripción de las variables cualitativas.

Variable	N	%	IC 95%
Sexo			
Mujer	20	34,5	21,4 ; 47,6
Hombre	38	60,5	52,4 ; 78,6
Tipo de tejido			
Normal	29	50,0	36,3 ; 63,7
Tumoral	29	50,0	36,3 ; 63,7
Tumor (pT, TNM)			
pT1	4	6,9	1,9 ; 16,7
pT2	6	10,3	1,7 ; 19,1
pT3	32	55,2	41,5 ; 68,8
pT4	16	27,6	15,2 ; 40,0
Ulceración del tumor			
No	10	17,2	6,7 ; 27,8
Sí	48	82,8	72,2 ; 93,3
Afectación de márgenes laterales quirúrgicos			
No	48	82,8	72,2 ; 93,3
Sí	10	17,2	6,7 ; 27,8
Invasión locorregional			
No	46	79,3	68,0 ; 90,6
Sí	12	20,7	9,4 ; 32,0
Grado de diferenciación histológica			
Bien diferenciado	4	6,9	1,9 ; 16,7
Moderadamente diferenciado	48	82,8	72,2 ; 93,3
Pobrememente diferenciado	6	10,3	1,7 ; 19,1
Inflamación peritumoral			
No	48	82,8	72,2 ; 93,3
Sí	10	17,2	6,7 ; 27,8
Invasión linfovascular			
No	22	37,9	24,6 ; 52,3
Sí	36	62,1	48,7 ; 75,4
Invasión perineural			
No	36	62,1	48,7 ; 75,4

Variable	N	%	IC 95%
Sí	22	37,9	24,6 ; 52,3
Linfadenectomía incompleta (<12g)			
No	34	58,6	45,1 ; 72,2
Sí	24	41,4	27,8 ; 54,9
Afectación ganglionar			
No	30	51,7	38,0 ; 65,5
Sí	28	48,3	34,6 ; 62,0
Ganglio (pN, TNM)			
pN0	30	51,7	38,0 ; 65,5
pN1	20	34,5	21,4 ; 47,6
pN2	8	13,8	4,1 ; 23,5
Depósitos tumorales			
No	56	96,6	88,1 ; 99,6
Sí	2	3,4	0,4 ; 11,9
Marcadores moleculares IMS			
MSH2 positiva	4	6,9	1,9 ; 16,7
MSH6 positiva	4	6,9	1,9 ; 16,7
MLH1 positiva	6	10,3	1,7 ; 19,1
PMS2 positiva	6	10,3	1,7 ; 19,1
IMS positiva	10	17,3	6,7 ; 27,8
IMS negativa	48	82,7	72,2 ; 93,3
Quimioterapia			
No	24	41,4	27,8 ; 54,9
Sí	34	58,6	45,1 ; 72,2
Expresión de K-Ras			
No realizado/No procede	50	86,2	76,5 ; 95,9
Mutado	6	10,3	1,7 ; 19,1
Nativo	2	3,4	0,4 ; 11,9
Recidiva Local			
No	52	89,7	81,0 ; 98,4
Sí	6	10,3	1,7 ; 19,1
Metástasis			
No	34	58,6	45,1 ; 72,2
Sí	24	41,4	27,8 ; 4,9

Variable	N	%	IC 95%
Localización de las metástasis			
Pleuropulmonares	16	27,6	15,2 ; 40,0
Hepáticas	8	13,8	4,1 ; 23,5
Peritoneales	6	10,3	1,7 ; 19,1
Recidivas ganglionares	4	6,9	1,9 ; 16,7
Exitus			
No	20	34,5	21,4 ; 47,6
Sí	38	65,5	52,4 ; 78,6

Del total de pacientes, 17 (58,6%) recibieron tratamiento con QT y 1 (3,4%) con RT, además otro recibió RT para una metástasis en esqueleto axial. El tratamiento QT más utilizado en nuestra serie fue la terapia adyuvante con Xelox[®] (Capezitabina asociada a Oxaliplatino) vía oral en 9 (31,0%). A lo largo de la evolución, 12 (41,4%) presentaron metástasis de localización pleuropulmonar en 8 (27,6%), hepáticas en 4 (13,8%), peritoneales 3 (10,3%) dos en uréter (6,9 %) y una a nivel del esqueleto axial (3,4%). Sólo 3 (10,3%) presentaron recidiva local del tumor en el citado periodo y 2 (6,9%) tuvieron dehiscencia de sutura.

El número de pacientes fallecidos fue de 19 (65,5%). De los que 16 (84,2%) fueron por causas relacionadas con el tumor. La supervivencia mediana (RIC) fue de 58,1 (39,6-108,8) meses.

El sistema TNM evalúa tres parámetros la "T" que mide el nivel de invasión del tumor en profundidad de la pared colónica en 32 (55,2 %) de los casos fue el tejido adiposo subseroso; la "N" que mide el número de ganglios linfáticos

regionales afectados siendo más frecuente en 30 (51,7%) que no exista afectación ganglionar y la “M” la diseminación del cáncer a distancia siendo en 34 casos (58,6 %) la ausencia de diseminación a distancia. El resto de la distribución del número de casos por estadio TNM se referencia en la tabla 9.

Tabla 9. Estratificación de las muestras estudiadas según la clasificación TNM anatomopatológica. Basado en la Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).

T	N	M
pT0: 0	pNX: 0	pM0:34(58.6)
pT1: 4* (6,9)	pN0: 30 (51,7)	pM1a:12(20,7)
pT2: 6 (10,3)	pN1a: 16 (27.6)	pM1b:6 (10,3)
pT3b: 32 (55,2)	pN1b: 4 (6.9)	pM1c:6 (10,3)
pT4: 16 (27,6)	pN1c: 0 (0.0)	
	pN2a: 4 (6.9)	
(*) Un caso con 2 tumores sincrónicos	pN2c: 4 (6.9)	

El estadio clínico (UIJJ) al final del seguimiento más frecuentemente descrito en nuestra muestra fue en IIA 16 (27,65) casos, seguido de los estadios en IVA 12 (20,7%) casos y del IIIB 8 (13,8%) (tabla 10).

Tabla 10. Distribución de los casos por estadio clínico (UIJJ).

Estadio Clínico	N	%	IC95%
0	2	3,4	0,4 ; 11,9
I	4	6,9	1,9 ; 16,7
IIA	16	27,6	15,2 ; 39,9
IIB	2	3,4	0,4 ; 11,9
IIIA	2	3,4	0,4 ; 11,9
IIIB	8	13,8	4,1 ; 23,5
IVA	12	20,7	9,4 ; 31,9
IVB	6	10,3	1,6 ; 19,1
IVC	6	10,3	1,6 ; 19,1
Total	58	100	

Cuando el estudio inmunohistoquímico para la expresión de las proteínas del sistema de reparación del ADN (*MMR proteins*, en sus siglas en inglés): se considera positivo, significa que se expresan las proteínas MMR y por lo tanto no existe inestabilidad de microsatélites y no hay necesidad de remitir el material para estudio molecular mutacional.

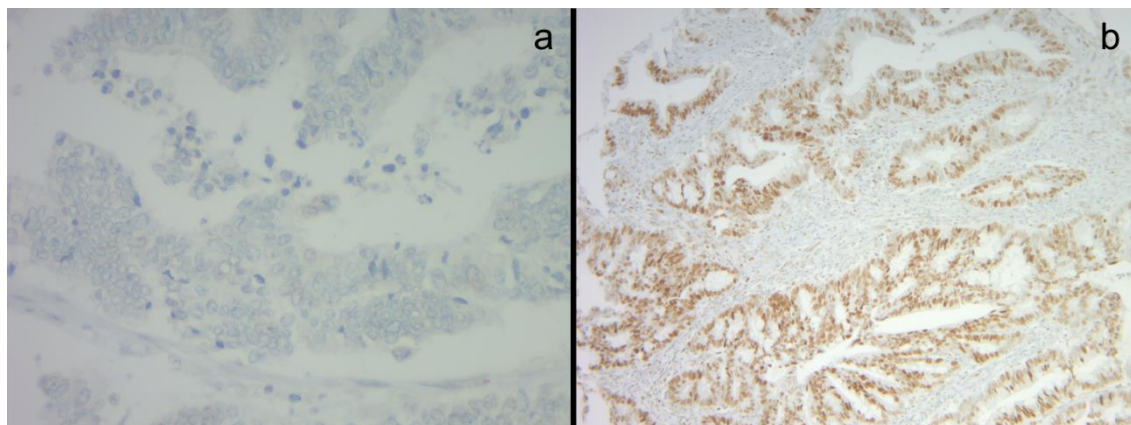


Ilustración 19. *Expresión inmunohistoquímica de IMS. a) tinción negativa (inestabilidad de microsatélites); b) tinción positiva (estabilidad de microsatélites).*

5.2 EXPRESIÓN DE LA SP Y NK1-R

Según la metodología de Allred, la **intensidad** de expresión de la SP en las células tumorales fue muy elevada tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear. La tinción a nivel citoplásmico se distribuía de forma granular en el 90 % de los casos, en un 5% de forma perinuclear recordando la distribución del aparato de Golgi y en el resto de los casos adoptaba un aspecto difuso. A nivel nuclear e 85% era de tipo reticular y el 15% era granular marcando en algunos casos el nucléolo de manera relevante (tabla 11).

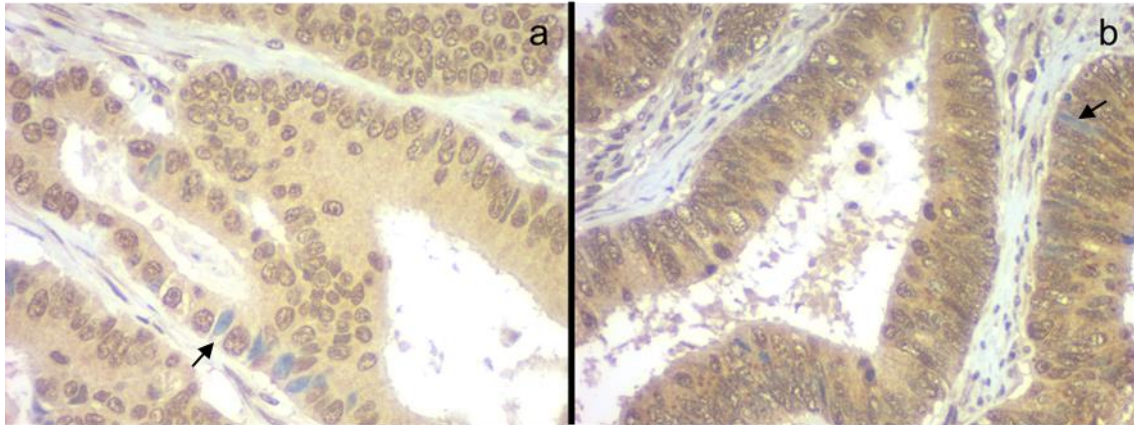


Ilustración 20. Tinción IHQ de SP: a) tinción citoplásmica difusa de intensidad moderada y b) tinción citoplásmica granular de intensidad fuerte. En ambas se aprecian la tinción reticular a nivel nuclear. Ver núcleos negativos en las células neuroendocrinas (flechas).

Tabla 11. Intensidad de la inmunotinción para SP en citoplasma y núcleo de las células tumorales del adenocarcinoma colorrectal.

Intensidad SP, N (%)	Citoplasma	Núcleo
0	0 (0)	10 (17,2)
1	36 (62,1)	23 (39,7)
2	20 (34,5)	21 (36,2)
3	2 (3,4)	4 (6,9)

La **extensión** de la expresión en las células tumorales del SP fue de moderada a intensa (de 2 a 4 puntos) en 51 (87,9%) muestras a nivel citoplásmico y en 35 (60,3%) muestras a nivel nuclear como puede verse en la tabla 12.

Tabla 12. Extensión de la inmunotinción contra SP en citoplasma y núcleo de las células tumorales del adenocarcinoma colorrectal.

Extensión SP, N (%)	Citoplasma	Núcleo
0	0 (0)	10 (17,2)
1	0 (0)	2 (3,4)
2	18 (31,0)	13 (22,4)
3	14 (24,1)	14 (24,1)
4	19 (32,8)	8 (13,8)
5	7 (12,1)	11 (19,0)

Cuando se calculó la puntuación global de Allred en las células tumorales, se demostró una mayor puntuación a nivel citoplasmático que a nivel nuclear (tabla 13).

Tabla 13. Puntuación global (Allred) de la inmunotinción contra SP en citoplasma y núcleo de las células tumorales del adenocarcinoma colorrectal.

Puntuación global SP, N (%)	Citoplasma	Núcleo
0	0 (0)	10 (17,2)
1	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	2 (3,4)
3	12 (20,7)	9 (15,5)
4	15 (25,9)	14 (24,1)
5	18 (31,0)	6 (10,3)
6	7 (12,1)	5 (8,6)
7	5 (8,6)	9 (15,5)
8	1 (1,7)	3 (5,2)

El valor 0 se considera negativo, mientras que de 2 a 8 puntos indica una expresión positiva del antígeno en la muestra.

La **intensidad** de expresión citoplásmica a nivel de las células tumorales del NK1-R fue baja-moderada con 54 (93.1 %) casos con una puntuación en el grupo 1 y 2 (tabla 14).

Tabla 14. Intensidad de la inmunotinción contra NK1-R en citoplasma de las células tumorales del adenocarcinoma colorrectal.

Intensidad NK1-R, N (%)	Citoplasma
0	0 (0)
1	31 (53,4)
2	23 (39,7)
3	4 (6,9)

De la misma manera la **extensión** de la inmunotinción frente a NK1-R fue alta a nivel citoplásmico en las células tumorales procedentes del CCR (tabla 15).

Tabla 15. Extensión de la inmunotinción contra NK1-R en citoplasma de las células tumorales del adenocarcinoma colorrectal.

Extensión NK1-R, N (%)	Citoplasma
0	0 (0)
1	6 (10,3)
2	25 (43,1)
3	13 (22,4)
4	6 (10,3)
5	8 (13,8)

Cuando se calculó la puntuación global de Allred varió desde 2 a 8 puntos. La puntuación obtenida en nuestra muestra fue muy alta con 21 (36,2%) igual o superior los 5 puntos (tabla 16).

Tabla 16. Puntuación global (Allred) de la expresión inmunohistoquímica NK1-R.

Puntuación global NK1-R, N (%)	Citoplasma
0	0 (0)
1	0 (0)
2	5 (8,6)
3	17 (29,3)
4	15 (25,9)
5	10 (17,2)
6	3 (5,2)
7	4 (6,9)
8	4 (6,9)
El valor 0 se considera negativo, mientras que de 2 a 8 puntos indica una expresión positiva del anticuerpo en la muestra.	

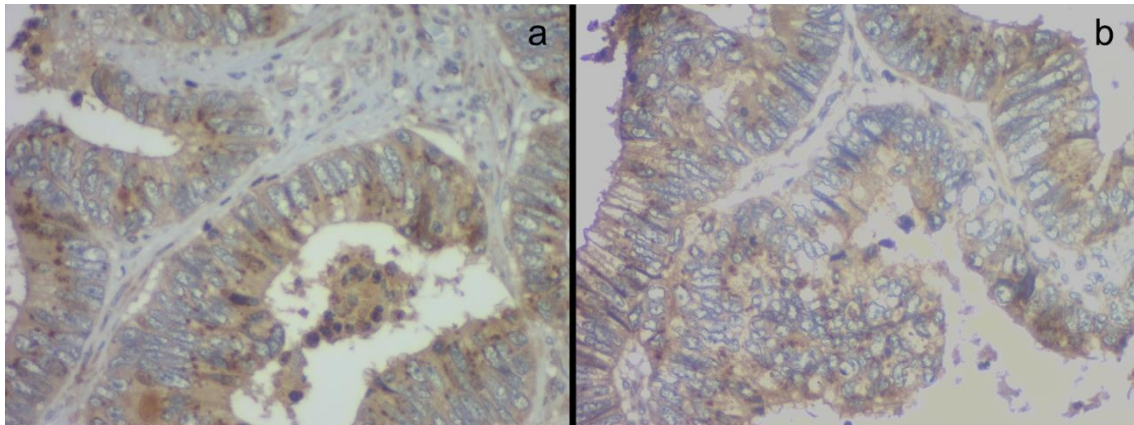


Ilustración 21. Tinción IHQ de NK1-R: a) tinción de membrana/citoplásmica de intensidad moderada y b) tinción membrana/citoplásmica de intensidad fuerte. En ambas se aprecian la tinción negativa a nivel nuclear.

En la tabla 17 se describen los valores de CEA a lo largo del seguimiento de los pacientes estudiados. Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo se realizó el Test de Friedman (test no paramétrico para muestras relacionadas) que demostró que existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p=0,0005$).

Tabla 17. Niveles séricos de CEA a lo largo del periodo de seguimiento.

Variable	N	mín	Máy	Mediana (P25 ; P75)
CEA preoperatorio, (ng/ml)	54	0,3	31,0	4,6 (0,9 ; 4,2)
CEA 2010, (ng/ml)	48	0,8	61,0	2,1 (1,3 ; 6,1)
CEA 2011, (ng/ml)	46	0,8	3190,0	2,2 (1,0 ; 6,4)
CEA 2012, (ng/ml)	44	0,7	5857,0	3,1 (1,2 ; 5,2)
CEA 2013, (ng/ml)	24	0,5	104,7	1,8 (0,9 ; 11,9)
CEA 2014, (ng/ml)	20	1,1	55,3	2,1 (1,3 ; 4,2)
CEA 2015, (ng/ml)	8	0,9	2,3	1,3 (1,0 ; 2,1)
CEA 2016, (ng/ml)	8	0,8	1,9	1,1 (0,8 ; 1,8)
CEA 2017, (ng/ml)	10	0,9	6,4	2,3 (1,05 ; 3,9)
CEA 2018, (ng/ml)	6	1,0	1,5	1,3 (1,0 ; 1,5)

En cuanto a la **Supervivencia General Específica** del **Cáncer** y la **Supervivencia Libre de Enfermedad**, se ha demostrado que algo más del 40 % sobreviven a los 5 años (tabla 18).

Tabla 18. Análisis descriptivo de SLE y SGEC a 1, 5 y 10 años

Variable	N	%	IC 95%
SLE 5 años	26	44,8	31,2 ; 58,5
SLE 10 años	8	13,8	4,1 ; 23,5
SGEC 5 años	24	41,4	27,8 ; 54,9
SGEC 10 años	8	13,8	4,1 ; 23,5
SLE: supervivencia libre de enfermedad (recidiva local y/o metástasis); SGEC: Supervivencia general específica del cáncer (exitus por CCR)			

5.3 ANÁLISIS BIVARIANTE

El análisis sobre la **intensidad** de la expresión inmunohistoquímica de la SP en los dos grupos de estudio (tejido normal vs tejido tumoral) puso de manifiesto que la intensidad de la tinción fue mayor en el grupo del tejido tumoral tanto en la expresión de la SP a nivel nuclear y del NK1-R a nivel citoplasmático ($p=0,017$ y $0,002$, respectivamente) (tabla 19).

Tabla 19. Intensidad de la inmunotinción en el tejido tumoral y tejido normal con anticuerpos anti SP y NK1-R.

Puntuación de Intensidad, N (%)	0 Nada	1 Débil	2 Intermedia	3 Fuerte
Tejido tumoral				
SP Citoplasma	0	17 (58,6)	10 (34,5)	2 (6,9)
SP Núcleo	4 (13,8)	7 (24,1)	14 (48,3)	4 (13,8)
NK1-R Citoplasma	0	9 (31,0)	16 (55,2)	4 (13,8)
Tejido normal				
SP Citoplasma	0	19 (6,5)	10 (34,5)	0
SP Núcleo	6 (20,7)	16 (55,2)	7 (24,1)	0
NK1-R Citoplasma	0	22 (75,9)	7 (24,1)	0

El análisis sobre la **extensión** de la expresión inmunohistoquímica de la SP en los dos grupos de estudio (tejido normal vs tejido tumoral) puso de manifiesto que la extensión de la tinción fue superior en el grupo del tejido tumoral para SP y NK1-R ($p=0,0005$ para las tres variables) (tabla 20).

Tabla 20. Extensión de la inmunotinción en el tejido tumoral y tejido normal con anticuerpos anti SP y NK1-R.

Puntuación de Extensión, N (%)	0	1	2	3	4	5
Proporción de células teñidas	0%	<1%	1%-10%	10%-33%	33%-66%	>66%
Tejido tumoral						
SP Citoplasma	0	0	2 (6,9)	4 (13,8)	16 (55,2)	7 (24,1)
SP Núcleo	4 (13,8)	0	1 (3,4)	5 (17,2)	8 (27,6)	11 (37,9)
NK1-R Citoplasma	0	0	5 (17,2)	10 (34,5)	6 (20,7)	8 (27,6)
Tejido normal						
SP Citoplasma	0	0	16 (55,2)	10 (34,5)	3 (10,3)	0
SP Núcleo	6 (20,7)	2 (6,9)	12 (41,4)	9 (31,0)	0	0
NK1-R Citoplasma	0	6 (20,7)	20 (69,0)	3 (10,3)	0	0

Se encontraron diferencias con significación estadística en la expresión global (intensidad más expresión) de la puntuación global de Allred para los dos anticuerpos estudiados (tabla 21).

Tabla 21. Diferencias en la expresión inmunohistoquímica de la SP y el NK1-R entre el tejido normal y tumoral.

Variable	Tipo de tejido			valor p
	Global N= 60	Normal N= 30	Tumoral N= 30	
SP Global Citoplasma, Med (RIC)	5,0 (5,0 ; 6,0)	4,0 (3,0 ; 4,0)	5,0 (5,0 ; 6,0)	0,0005
SP Global Núcleo, Med (RIC)	4,0 (3,0 ; 5,0)	3,0 (2,0 ; 4,0)	6,0 (4,0 ; 7,0)	0,0005
NK1-R Citoplasma, Med (RIC)	6,0 (6,0 ; 7,0)	3,0 (3,0 ; 4,0)	5,0 (4,0 ; 7,0)	0,0005

Med: Mediana; RIC: recorrido intercuartílico expresado como (P25 ; P75). Prueba de contraste: U de Mann-Whitney

En nuestra muestra, no se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión de SP/NK1-R y el grado de invasión tumoral medido por el parámetro pT de la clasificación TNM (tabla 22). Tampoco hemos encontrado asociación con significación estadística entre la extensión regional ganglionar pN (adenopatías incluyendo depósitos tumorales) ni invasión de los márgenes laterales quirúrgicos ni la invasión loco-regional con la inmunoexpresión de estos dos anticuerpos.

Tabla 22. Distribuciones de la expresión de la SP y NK1-R según el grado de invasión del tumor (pT de la clasificación TNM).

Variable, Mediana (RIC)	Global N= 58	Tumor (pT, TNM)				valor p
		pT1 N=4	pT2 N=6	pT3 N=32	pT4 N=16	
Expresión SP citoplasma	5,0 (4,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (4,0 ; 6,0)	5,0 (4,0 ; 5,5)	5,0 (4,0 ; 5,0)	0,784
Expresión SP núcleo	4,0 (3,0 ; 6,0)	5,0 (4,0 ; 6,5)	4,5 (3,0 ; 6,0)	4,0 (1,5 ; 5,5)	4,0 (2,5 ; 6,5)	0,609
Expresión NK1-R	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,5 (3,5 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	0,972

En el análisis realizado entre las variables grado histológico de la neoplasia y expresión de SP y recetor NK1-R no se ha encontrado asociación estadísticamente significativa (tabla 23). Tampoco se ha encontrado asociación con la invasión linfovascular.

Tabla 23. Análisis comparativo entre el grado de diferenciación histológica y el grado de expresión de SP / NK1R

Variable, Mediana (RIC)	Grado histológico (diferenciación)				valor p
	Global	Bien	Moderadamente	Pobrementemente	
	N= 58	N= 4	N=48	N=6	
Expresión SP citoplasma	5,0 (4,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 6,0)	0,377
Expresión SP núcleo	4,0 (3,0 ; 6,0)	5,0 (3,5 ; 6,5)	4,0 (3,0 ; 5,5)	5,5 (4,0 ; 7,0)	0,271
Expresión NK1-R	4,0 (3,0 ; 5,0)	3,5 (2,5 ; 4,5)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,5 (3,0 ; 6,0)	0,531

Los estudios más recientes del CCR le dan un papel relevante a la respuesta inmune del ambiente peritumoral por lo que este parámetro tiene una posible relevancia clínico terapéutica. En nuestro estudio, se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre la expresión de la SP a nivel nuclear y la presencia de respuesta inflamatoria peritumoral. Esta asociación no ha podido demostrarse cuando analizamos la expresión de SP ni de su receptor NK1-R a nivel citoplásmico (tabla 24).

Tabla 24. Expresión global de SP y NK1-R dependiendo de la presencia de inflamación peritumoral.

Variable, Mediana (RIC)	Inflamación peritumoral			valor p
	Global	No	Sí	
	N= 58	N= 48	N=10	
Expresión SP citoplasma	5,0 (4,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	4,5 (3,0 ; 5,0)	0,283
Expresión SP núcleo	4,0 (3,0 ; 6,0)	3,0 (0,0 ; 4,5)	5,0 (4,0 ; 7,0)	0,004
Expresión NK1-R	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	0,453

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la SP a nivel nuclear entre las muestras que presentaban invasión perineural (mediana 4,0) y las que no la tenían (mediana 3,0) ($p=0,024$) (tabla 25).

Tabla 25. Puntuación global (Allred) de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK1R dependiendo de la existencia de invasión perineural.

Variable, Mediana (RIC)	Global N= 58	Invasión perineural		valor p
		No N= 36	Sí N=22	
Expresión SP citoplasma	5,0 (4,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 5,5)	4,5 (3,0 ; 5,0)	0,294
Expresión SP núcleo	4,0 (3,0 ; 6,0)	3,0 (0,0 ; 4,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	0,024
Expresión NK1-R	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	0,950

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la NK1-R a nivel citoplásmico entre las muestras que presentaban metástasis a distancia (mediana 5,0) y las que no la tenían (mediana 4,0) ($p=0,047$) (tabla 26).

Tabla 26. Puntuación global (Allred) de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK1-R dependiendo de la existencia de metástasis a distancia.

Variable, Mediana (RIC)	Global N= 58	Metástasis a distancia		valor p
		No N= 30	Sí N=28	
Expresión SP citoplasma	5,0 (4,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	0,174
Expresión SP núcleo	4,0 (3,0 ; 6,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	4,0 (1,0 ; 5,5)	0,433
Expresión NK1-R	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 4,0)	5,0 (3,0 ; 7,0)	0,047

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SP nuclear entre las muestras que presentaban recidiva local (mediana 1,5) y las que no la tenían (mediana 4,0) ($p=0,049$) (tabla 27).

Tabla 27. Puntuación global (Allred) de la expresión inmunohistoquímica de SP/NK1-R dependiendo de la existencia de recidiva local.

Variable, Mediana (RIC)	Global N= 58	Recidiva local		valor p
		No N= 52	Sí N=6	
Expresión SP citoplasma	5,0 (4,0 ; 5,0)	5,0 (4,0 ; 5,0)	4,5 (4,0 ; 5,0)	0,832
Expresión SP núcleo	4,0 (3,0 ; 6,0)	4,0 (3,0 ; 6,0)	1,5 (0,0 ; 4,0)	0,049
Expresión NK1-R	4,0 (3,0 ; 5,0)	4,0 (3,0 ; 5,0)	3,0 (3,0 ; 4,0)	0,334

5.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se realizan distintos modelos univariantes de riesgos proporcionales de Cox de supervivencia libre de enfermedad a 10 años, donde cada variable constituye un modelo (tabla 28).

Tabla 28. Modelos univariantes de riesgos proporcionales de Cox (cada variable constituye un modelo por separado) (supervivencia libre de enfermedad [SLE] a 10 años).

SLE a 10 años			
Modelo univariante	HR	IC 95%	valor p
Sexo	2,27	0,90 ; 5,73	0,083
Infiltración perineural	2,60	0,90 ; 7,60	0,079
KRas			
No	1,00		
Nativo	7,45	1,50 ; 36,94	0,014
Mutado	17,90	5,31 ; 60,42	0,0005
Tumor (pT) [\leqpT3/pT4]	0,44	0,20 ; 0,98	0,045
Ganglios (pN) [pN0/\geqpN1]	2,04	0,92 ; 4,53	0,079
Quimioterapia	80,10	3,27 ; 1960,00	0,007
SP global citoplasma	1,09	0,83 ; 1,44	0,527
SP global núcleo	0,97	0,83 ; 1,13	0,65
NK1-R global	1,25	1,01 ; 1,56	0,04
IMS	1,92	0,76 ; 4,85	0,17

Se seleccionaron las variables cuya asociación con la SLE a 10 años tuvo una significación estadística $p \leq 0,15$ y se incluyeron en los modelos de Cox. En el modelo univariante de riesgos proporcionales demostraron significación estadística ($p \leq 0,15$) las siguientes variables sexo, infiltración perineural,

presentar k-Ras nativo o mutado, nivel de infiltración \geq pT4, afectación ganglionar pN \geq 1, haber recibido QT y expresión de NK1-R global (tabla 28).

Se obtuvieron nueve modelos bivariantes en los que se demuestra que controlando por otras variables cada punto de expresión de NK1-R de más incrementa el riesgo de manera significativa (tablas 29 – 30). Controlando por las variables nivel de infiltración, afectación ganglionar, infiltración perineural e IMS el riesgo se incrementa de manera significativa ($p=0,0005$).

Tabla 29. Modelos bivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia libre de enfermedad [SLE] a 10 años). Variable principal: Expresión NK1-R de las células tumorales.

SLE a 10 años			
Modelo bivalente 1	HR	IC 95%	valor p
NK1-R global núcleo	1,14	0,93 ; 1,40	0,205
KRas			
No	1		
Nativo	5,77	1,11 ; 30,16	0,038
Mutado	16,23	4,75 ; 55,45	0,0005
Modelo bivalente 2			
NK1-R global núcleo	1,31	1,04 ; 1,64	0,021
Sexo			
Mujer	1		
Hombre	2,6	1,01 ; 6,71	0,049
Modelo bivalente 3			
NK1-R global núcleo	1,23	0,997 ; 1,53	0,054
Infiltración perineural	2,474	0,850 ; 7,20	0,097
Modelo bivalente 4			
NK1-R global núcleo	1,16	0,93 ; 1,45	0,18
Ganglios (pN) [pN0/ \geq pN1]	1,83	1,08 ; 3,10	0,026
Modelo bivalente 5			
NK1-R global núcleo	1,29	1,03 ; 1,61	0,027
IMS	2,2	0,85 ; 5,68	0,104

Tabla 30. Modelos bivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia libre de enfermedad [SLE] a 10 años). Variable principal: Expresión de K-Ras las células tumorales.

SLE a 10 años			
Modelo bivalente 6	HR	IC 95%	valor p
Kras			
No	1		
Nativo	8,64	1,73 ; 43,10	0,009
Mutado	16,17	4,81 ; 54,39	0,0005
Infiltración perineural	2,47	0,84 ; 7,27	0,100
Modelo bivalente 7			
Kras			
No	1		
Nativo	9,55	1,87 ; 48,91	0,007
Mutado	16,87	4,88 ; 58,30	0,0005
Tumor (pT) [\leqpT3/pT4]	2,29	0,99 ; 5,29	0,052
Modelo bivalente 8			
KRas			
No	1		
Nativo	13,15	2,38 ; 72,69	0,003
Mutado	20,46	5,78 ; 72,47	0,0005
Ganglios (pN) [pN0/\geqpN1]	2,7	1,13 ; 6,48	0,026
Modelo bivalente 9			
KRas			
No	1		
Nativo	9,11	1,79 ; 46,37	0,008
Mutado	20,56	5,92 ; 71,47	0,0005
IMS	2,57	0,96 ; 6,90	0,061

Basado en los modelos bivariantes se obtuvieron varios modelos multivariantes (tablas 31 – 32). Controlando las variables expresión de K-Ras, afectación ganglionar e infiltración perineural, por cada punto de expresión de SP a nivel nuclear se disminuye de manera significativa la SLE a los 10 años en 0,79 ($p=0,022$).

Controlando las variables sexo, infiltración perineural, afectación ganglionar y expresión de K-Ras y NK1-R; por cada punto de incremento de SP a nivel nuclear disminuye la SLE a los 10 años en 0,72 ($p=0,001$)

Tabla 31. Modelos Multivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia libre de enfermedad [SLE] a 10 años). Variable principal: Expresión de K-Ras las células tumorales.

SLE a 10 años			
Modelo multivariante 1	HR	IC 95%	valor p
KRas			
No	1		
Nativo	12,93	2,34 ; 71,36	0,03
Mutado	19,24	5,34 ; 69,35	0,0005
Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	2,27	0,76 ; 6,73	0,14
Tumor (pT) [≤pT3/pT4]	1,34	0,47 ; 3,82	0,58
Modelo multivariante 2			
KRas			
No	1		
Nativo	14,11	2,54 ; 78,36	0,002
Mutado	22,13	6,14 ; 79,71	0,0005
Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	2,4	0,98 ; 5,89	0,056
IMS	1,99	0,721 ; 5,51	0,184
Modelo multivariante 3			
KRas			
No	1		
Nativo	22,77	3,86 ; 134,29	0,001
Mutado	34,62	8,48 ; 141,30	0,0005
Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	3,51	1,42 ; 8,67	0,006
Infiltración perineural	5,84	1,72 ; 19,85	0,005
SP global núcleo	0,79	0,64 ; 0,97	0,022

En el 50% de los pacientes con CCR metastásico cuyos tumores expresaban K-Ras nativo las recidivas aparecían a los 11,7 meses mientras que

en aquellos con K-Ras mutado aparecían a los 14,5 meses a diferencia que aquellos que inicialmente no tenían metástasis las presentan a los 54,1 meses.

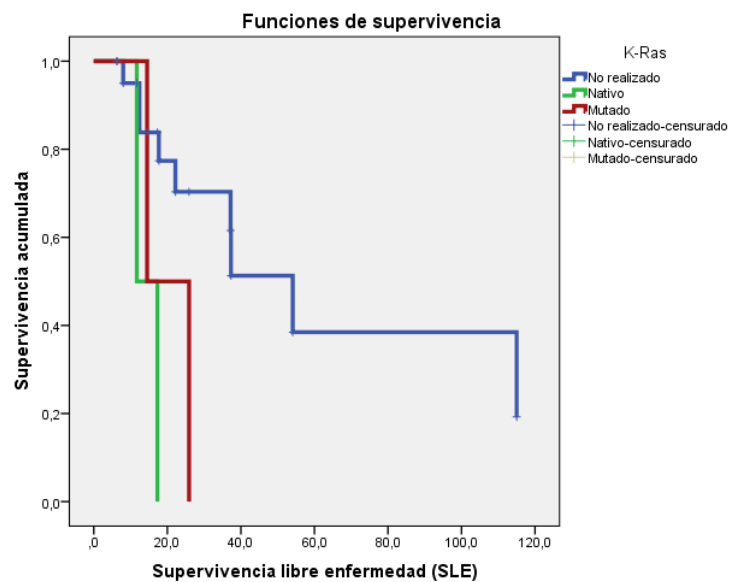


Figura 1. Curva de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años (Kaplan-Meier) según la expresión del oncogén K-Ras.

El 50 % de los pacientes que mostraba en el estudio histopatológico de la pieza de recto-sigmoidectomía invasión perineural presentaron recurrencia de la enfermedad a los 17,7 meses a diferencia de los que no tenían invasión perineural que presentaron recidivas a los 54,1 meses.

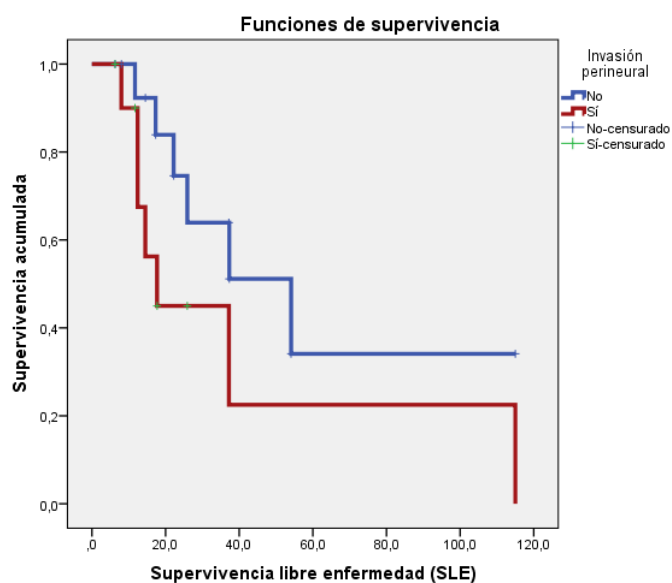


Figura 2. Curva de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años (Kaplan-Meier) según la presencia de invasión perineural.

Tabla 32. Modelos Multivariantes de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia libre de enfermedad [SLE] a 10 años). Variable principal: Expresión de K-Ras las células tumorales.

SLE a 10 años			
Modelo multivariante 4	HR	IC 95%	valor p
NK1-R global	1,33	1,06 ; 1,70	0,016
Sexo	4,75	1,63 ; 13,87	0,004
Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	3,34	1,43 ; 7,82	0,005
Modelo multivariante 5			
NK1-R global	1,34	1,06 ; 1,69	0,015
Sexo	5,71	1,85 ; 17,64	0,002
Infiltración perineural	3,16	1,07 ; 9,38	0,038

Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	3,96	1,65 ; 9,51	0,002
Modelo multivariante 6			
NK1-R global	1,41	1,12 ; 1,77	0,003
Sexo	5,29	1,76 ; 15,88	0,003
Infiltración perineural	3,53	1,20 ; 10,44	0,022
Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	3,71	1,53 ; 8,98	0,004
SP global núcleo	0,86	0,73 ; 1,00	0,05
Modelo multivariante 7			
NK1-R global	1,39	1,11 ; 1,76	0,0005
Sexo	3,83	1,14 ; 12,81	0,029
Infiltración perineural	6,21	1,88 ; 20,46	0,003
Ganglios (pN) [pN0/≥pN1]	5,5	2,04 ; 14,86	0,001
SP global núcleo	0,72	0,59 ; 0,89	0,001
KRas			
No	1		
Nativo	19,35	2,89 ; 129,72	0,002
Mutado	31,2	6,64 ; 146,69	0,0005

Solo se ha obtenido un modelo valido de riesgos proporcionales de Cox para la Supervivencia general específica del cáncer a 10 años en el que se ha demostrado que controlando por la expresión de K-Ras el grado de infiltración tumoral incrementa el riesgo recurrencia de manera significativa (HR 2,5; IC95%: 1,21;5,15; p=0,014).

Tabla 33. Modelos Univariante de riesgos proporcionales de Cox (supervivencia general específica del cáncer [SGEC] a 10 años). Variable principal: Expresión de K-Ras las células tumorales.

SGEC a 10 años			
Modelo univariante	HR	IC 95%	valor p
Tumor (pT) [≤pT3/pT4]	2,07	1,21 ; 5,15	0,014
Estadio clinico (<IV/IV)	2,2	1,00 ; 4,84	0,05
Recurrencia	2,35	1,00 ; 5,52	0,05

SGEC a 10 años			
Modelo univariante	HR	IC 95%	valor p
KRas			
No	1		
Nativo	3,91	0,85 , 18,05	0,081
Mutado	2,93	1,13 ; 7,61	0,028
Quimioterapia	4,43	1,04 , 18,82	0,044
SP global citoplasma	0,68	0,47 ; 0,97	0,033
SP global núcleo	0,87	0,75 ; 1,01	0,063

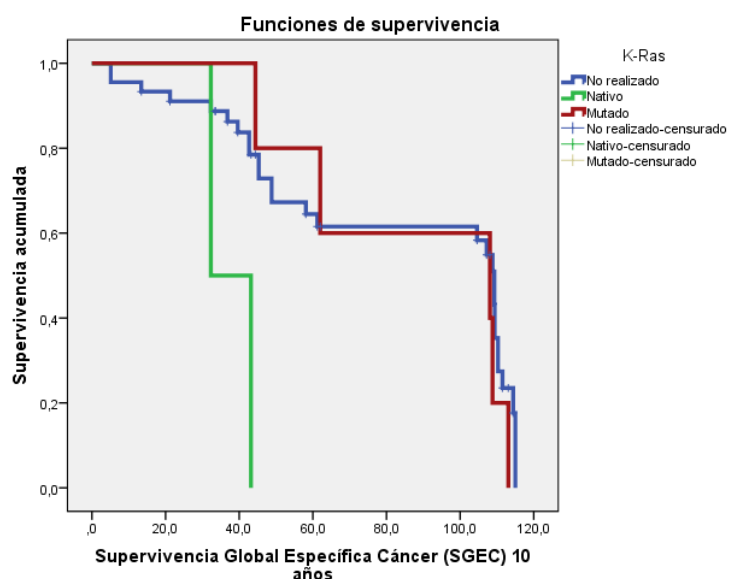


Figura 3. Curva de supervivencia general específica del cáncer (SGEC) a 10 años (Kaplan-Meier) según la expresión del oncogén K-Ras.

En las muestras analizadas el 50% de los pacientes que expresaban K-Ras nativo fallecieron antes de los 32,3 meses, a diferencia de aquellos que expresaban K-Ras mutado que se comportaban de manera parecida a los pacientes sin metástasis.

DISCUSIÓN

6 **DISCUSIÓN**

Confirmamos la expresión de SP/NK1-R en el CCR, siendo la expresión superior en el tejido tumoral que en el normal. Se ha demostrado por primera vez la asociación entre la expresión de la SP a nivel nuclear en las células tumorales con la respuesta inflamatoria peritumoral, la invasión perineural, la recurrencia de enfermedad (recidiva local y/o metástasis) y la SGEC (Supervivencia general específica del cáncer). La expresión de NK1-R se asocia con desarrollo de metástasis pleuropulmonares y con la SLE (Supervivencia libre de enfermedad). En este estudio, se ha confirmado la inmunolocalización de SP y NK1-R en muestras humanas de colon normal y del CCR. Nuestro principal hallazgo es que la SP y su NK1-R se expresaron en mayor grado en el tejido tumoral que en el normal siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Todas las muestras de tejido normal y tumoral expresaron SP tanto a nivel citoplásmico como a nivel nuclear. La tinción de NK1-R a nivel de la membrana fue superior en el tejido tumoral que en el tejido normal tanto a nivel de la intensidad como a nivel de la extensión. Esta misma diferencia se han visto en la expresión (intensidad y extensión) de la SP tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear. A pesar de que nuestra muestra es más pequeña, los resultados concuerdan con los comunicados por otros autores (2,155,202). A nivel citoplásmico la tinción podía distribuirse de manera difusa o granular apreciando en algunas células una distribución perinuclear polarizada hacia la zona del

borde en cepillo pudiendo relacionarse con el área donde se distribuyen las cisternas del sistema retículo-endosomal. A nivel nuclear el patrón predominante era de tipo reticular.

El estudio inmunohistoquímico de SP sobre tejido sano indica que prácticamente la totalidad de las muestras (95%) expresaban en mayor o menor grado SP. Es importante reseñar que la localización predominante fue en los enterocitos de las capas basales de las criptas. Este dato coincide con el hecho demostrado de que la SP es un potente agente mitógeno ya que es en esta localización del tejido epitelial sano donde se producen las divisiones celulares que conforman la renovación continua del epitelio y en el tejido tumoral en aquellas áreas donde se están replicando las células de manera descontrolada. Estos resultados parecen indicar que la SP, además de otras muchas funciones biológicas, tiene la capacidad de inducir la replicación celular en los tejidos donde se localiza. La coincidencia de la tinción de SP en las células basales puede indicar que estas células tengan la capacidad de replicación celular autónoma por pérdida de genes de la muerte celular programada demostrando así que el valor mitógeno, demostrando que desempeña un papel en el desarrollo y mantenimiento del CCR.

La expresión inmunohistoquímica del receptor NK1-R en el tejido neoplásico fue de distribución intracitoplasmática de tipo granular y en la

membrana celular. Este hecho hace que el receptor NK1-R al unirse con la SP induce la mitosis en las células cancerígenas.

La acción mitogénica mediada por SP es un hecho demostrado en la literatura (2,119,120,153,203–209). El mecanismo molecular por el que el NK1-R induciría la mitogénesis una vez que el receptor es activado por su ligando, la SP, el NK1-R activa en cascada de las protein cinasas actividades por mitógenos MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), incluyendo las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y la p38MAPK. Estas rutas son a menudo activadas bajo distintas condiciones y pueden llevar tanto al crecimiento como a la apoptosis celular (210)(211).

El mecanismo por el que esta señal se transmite de forma guiada hacia su destino es desconocido, no obstante, la explicación podría encontrarse en unos complejos de proteínas “estructurales” que determinan la localización subcelular y determinan la especificidad de las proteínas señalizadoras (212)(213). El mecanismo principal por que los GPCRs activan la ruta descrita de las cinasas es por la liberación de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G(214). Estas subunidades reclutan componentes de la vía ras, como shc, grb2 y scr que conducen a la activación de raf-1 y MAP cinasa 1, un activador específico del ERK1/2 (215) La alteración de alguna de las cuatro vías descritas confiere a las células neoplásicas la capacidad de dividirse con independencia de las señales de crecimiento.

Un componente de la ruta de señalización de MAPK ha sido recientemente identificada la β -arrestina(214), la cual en principio se pensó que solo mediaba el desacoplamiento y la internalización del receptor, el cual parece ser necesaria para la activación del ERK1/2 en gran número de GPCRs (61). En el caso de los receptores activados por proteínas 2 (PAR2), la β -arrestina forma un complejo con el receptor internalizado, raf-1 y ERK1/2, reteniendo las cinasas activadas en el citoplasma. Por otro lado, los complejos de proteínas estructurales, pueden determinar la locación subcelular y la especificidad sobre el receptor ERK1/2 y de este modo, dirigir el potencial mitogénico de la señal dada. Existe una variante del complejo β -arrestina que contiene el receptor adrenérgico β 2 y la tirosin-cinasa SCR, la cual conduce también a la activación del ERK1/2 siendo un importante punto de convergencia de diferentes rutas de señalización y ayudan a entender su participación en procesos fisiopatológicos y su posible utilidad diagnóstica o terapéutica(216).

La activación de esta ruta produce una respuesta celular distinta a la descrita anteriormente, posiblemente esto se debe a una diferente localización subcelular de las cinasas activadas por el mecanismo antes mencionado. La SP induce la formación de complejos multienzimáticos cerca de la membrana plasmática que contienen NK1R, β -arrestina, src y ERK1/2. Una vez activado, ERK1/2 se transloca en el núcleo de tal modo que se induce la proliferación y protege a la célula de la apoptosis.

La SP estimula la proliferación celular un ejemplo de este hecho es se puede observar en la colitis microscópica el mecanismo es llevado a cabo mediante la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de MAPK 387 de modo que en los enterocitos activan metaloproteinasas de la matriz que inducen la liberación de TGF. Se ha podido demostrar la relación entre SP y ciertos oncogenes, así pues, han demostrado recientemente que la SP induce la transcripción de RNA mensajero de c-myc en la línea celular U-373MG. En dicha línea celular, el uso de Tyrohostin A25, un bloqueador de la actividad tirosin-cinasa, inhibió significativamente la mitogénesis inducida por la SP, lo que sugiere la implicación de la fosforilación por protein-cinasa en la función mitogénica de la SP. La estimulación de del NK1R activa la fosforilación de la tirosina y la actividad enzimática de ERK1/2 así como de las MAPK.

La habilidad para regular la activación Ras y la ruta MAPK por parte del receptor acoplado a proteínas G (GRKs) es un punto de control para la regulación del crecimiento celular (216). Algunos estudios indican que la activación de MAPK inducida por SP requiere la presencia de un dominio funcional EGFR cinasa, así mismo se ha visto que la ruta de señalización de EGFR está relacionada con la activación Ras (217). Este fenómeno puede además ayudar a potenciar la activación de caminos de señalización adicionales en los que las arrestinas actúan como adaptadores regulados por agonistas. Se ha demostrado que el mecanismo de transactivación del EGFR por parte del complejo SP/NK1R en las células epiteliales del colon, produce la activación de

metaloproteinasas de la matriz (TAPI-1-sensitive), el cual es capaz de separar el precursor proTGF α anclado a membrana, conduciendo a la aparición de su forma madura en el espacio extracelular. El TGF α , que está relacionado con el EGFR, causa tanto su activación como la activación de la vía MAPK induciendo la proliferación de enterocitos y células de astrocitomas. Esta ruta puede participar tanto en la proliferación celular mediada por SP de varias líneas celulares, así como en el daño mucosa de la colitis crónica. Finalmente, estas señales inducidas por NK1-R tienen cierta relevancia en las nuevas tendencias de que el complejo SP/NK1-R con una capital importancia en el desarrollo y progresión del crecimiento de tumores de distinta etiología incluyendo cáncer de páncreas, gliomas humanos, cáncer de mama, así como en el caso que nosotros estudiamos el CCR.

Se conoce que la SP estimula la mitogénesis activando NK1-R tanto en células normales como neoplásicas.

Estos resultados coinciden con otros estudios inmunohistoquímicos realizados para otros tejidos tumorales en gliomas humanos, astrocitomas y neuroblastomas (119,120,153,202,207) como ya demuestran Muñoz y Coveñas en las distintas publicaciones(153,155,205,206,218–220).

El aumento de los NK1-R en la membrana celular, sería el mecanismo por el que la SP produciría sólo en estas células un aumento de las señales mitogénas contrarrestando las diferentes señales apoptóticas o señales pro-

senescencia en la población de células neoplásicas según propone Esteban et al(148) en sus estudios. La regulación de la estabilidad del genoma y la protección frente a las transformaciones malignas son procesos complejos en los que están involucrados una variedad de mecanismos, como por ejemplo la inhibición del ciclo celular cuando un oncogén se activa (221–223). Parece ser que células en senectud existen en tejidos en estadio pre-maligno pero no en los malignos(224) Existen pruebas que indican que escapar de la senectud o la adquisición de la inmortalidad celular es importante para la transformación maligna. La proliferación autónoma celular es un objetivo que alcanzan las células cancerosas por medio de la activación de oncogenes promotores del crecimiento. Esta activación dispara la apoptosis celular en un intento de contrarrestar el desarrollo del cáncer (225) El mecanismo por el que el tumor contrarresta este intento de autólisis celular es desconocido. Se propone que la SP podría jugar un papel clave en este proceso todavía confuso. Así, la activación del ERK2 por el NK1-R podría producir la translocación celular del Nur-77, como ha sido demostrado por Castro-Obregón et al. (226). Esto podría representar un nuevo y rápido factor de crecimiento de supervivencia independiente de la regulación génica.

Estos hallazgos sugieren que el sistema SP/NK1-R desempeña un papel importante en la carcinogénesis del cáncer colorrectal (202), como también se ha descrito en el carcinoma gástrico (2,120,227). En este mismo sentido se ha demostrado la presencia de SP en el citoplasma y el núcleo de varias células

tumorales humanas: células escamosas orales, odontogénicas, cáncer de laringe, cáncer de pulmón y cáncer de mama (155,204,207,228–230). Por el contrario, Berger et al., no encontraron expresión de la SP a nivel nuclear en las células de hepatoblastoma (228) lo que pudiera estar relacionado con el hecho de que es un tumor pediátrico de origen embrionario (120).

Numerosos estudios llevados a cabo en líneas tumorales tanto a nivel de la neoplasia como en el estroma adyacente incluyendo el microambiente y los segmentos linfo-vasculares demuestran la existencia del NK1-R.

Se ha documentado que los tumores sólidos consiguen realizar la angiogénesis peritumoral secretando factores proangiogénicos (231). Se ha postulado que la estimulación de la SP a través del NK1-R sea un mecanismo más sencillo de obtener neovasos sanguíneos en lugar de activar otras vías más complejas. De otro lado la misma sobreexpresión de la SP y el NK1-R podría regular indirectamente el crecimiento de la neoplasia.

La proliferación de neovasos es un proceso secuencial de vital importancia para las neoplasias para garantizarse el sustento metabólico que se acompaña de la maduración del sistema de regulación neurovascular endógeno (232). Este proceso conlleva en principio una proliferación endotelial, seguido de la neoformación de vasos sanguíneos y posteriormente un incremento de su flujo sanguíneo. El último paso implica la maduración de distintos sistemas de regulación no solo a nivel vascular sino

también a nivel neural. El proceso neoangiogénico asentado sobre vasos existentes es una característica común de los tejidos sometidos a inflamación crónica, así como de aquellos en los que se ha producido una herida. Por otro lado, este proceso aparece también en el contexto de la progresión tumoral a medida que la masa va necesitando más recursos para su desarrollo.

La neoangiogénesis, es un factor fundamental en el desarrollo tumoral, se ha asociado con un aumento de la invasión y expresión de los receptores NK1-R (231). El aumento de las fibras nerviosas en los tumores podría ser relevante en el crecimiento tumoral y en desarrollo de metástasis. Por lo tanto, los estudios actuales no solo proporcionan nuevas áreas para la intervención terapéutica, sino que también pueden proporcionar marcadores futuros de progresión tumoral. Esta y otras funciones de los neuropéptidos relacionados con la SP / NK1-R sugieren que su expresión aumentada en las células neoplásicas puede permitir el inicio, la integración y la modificación eventual del microambiente.

Existen estudios demuestran la capacidad de la SP para inducir la proliferación endotelial tanto in vitro como in vivo. Esta capacidad es mediada únicamente para el NK1-R sin tener en cuenta el NK2-R ni NK3-R. Además, se ha demostrado que este efecto es dosis dependiente siendo máximo para concentraciones de SP entre 1 y 10 nM.

Existe otro mecanismo de regulación indirecta mediante un mecanismo paracrino de la SP liberada por las células de carcinoma colorrectal que

estimularía el VEGF A activando la vía de la angiogénesis(232). Actualmente existen anticuerpos específicos contra el VEGF. Además células supresoras del sistema inmune de tipo mieloide Gr+CD11b+ pueden diferenciarse a células endoteliales y directamente incorporarse al endotelio tumoral en animales portadores de tumores(233). Otras mediadores solubles derivados de células inflamatorias que son conocidos como moduladores del desarrollo del cáncer son las proteasas de serina y cisteína, los agentes perforantes de membrana ,TNF- α , interleuquinas e interferones(232). Juntos, los mediadores solubles derivados del huésped es conocido que activan la respuesta inmune innata, remodelamiento tisular y angiogénesis creando un microambiente favorable a la proliferación celular , inestabilidad genómica y expansión de poblaciones celulares hacia microambiente de tejidos ectópicos terminando en la transformación maligna y desarrollo de la neoplasia (232).

En los casos estudiados la invasión perineural se asociaba a una menor supervivencia. Una de las características de las células malignas es su capacidad para disociarse del tumor primario y establecer depósitos metastásicos a distancia. Los vasos sanguíneos y linfáticos son rutas bien aceptadas de diseminación. La invasión perineural otra vía de diseminación tumoral y se asocia con un mal pronóstico en diversas neoplasias malignas incluidas en CCR, cáncer pancreático, de próstata, cabeza y cuello, tracto biliar y estómago (234–238). La invasión perineural se ha asociado en muchas series de casos como un fenómeno prevalente en el CCR llegando a aparecer hasta en

el 33 % de los casos en el momento de la resección. Diversos estudios han puesto de manifiesto una correlación estadísticamente significativa entre la invasión perineural en el CCR y un aumento en las tasas de recurrencia, supervivencia a los 5 años, así como un aumento de la probabilidad de encontrar enfermedad metastásica en el momento de la extirpación. Además, este estudio ha permitido demostrar que la expresión de SP a nivel nuclear se relaciona de manera estadísticamente significativa con la invasión perineural, resultados que concuerdan con los obtenidos por primera vez por Li et al en 2013 (239), quienes afirman que la SP es un mediador de la interacción entre las células tumorales y el sistema nervioso, y promueve la proliferación, invasión y neurotropismo del cáncer de páncreas. Luego la SP parece promover la invasión perineural en el cáncer. Por tanto, el tratamiento con antagonistas SP/NK-1R se puede convertir en una estrategia terapéutica para evitar la diseminación vía perineural del CCR.

Existen evidencias epidemiológicas que sugieren que la inflamación crónica y/o la infección crónica se asocian con el desarrollo del cáncer y el proceso inflamatorio puede jugar un papel crucial en el proceso de la carcinogénesis y en el pronóstico del CCR. La SP/NK1-R de igual manera están asociadas a la progresión del cáncer y a la aparición de metástasis como se descrito anteriormente. Además, Chen et al. al igual que en nuestro estudio concluye que la SP es un modulador proinflamatorio y que su nivel de expresión está asociado con diferentes estadios del desarrollo del CCR lo mismo que

ocurre en nuestro estudio. Los resultados indican que el proceso inflamatorio está involucrado en el microambiente tumoral. En este estudio, no se ha conseguido demostrar que exista una asociación con significación estadística entre la presencia de inflamación peritumoral con el exitus, con la presencia de recurrencia o con estadio tumoral; en contra de los resultados documentados por Chen et al. (202). Los hallazgos obtenidos por Gillespie et al. ponen de manifiesto que la versión truncada de NK1-R está incrementada en la colitis asociada al cáncer lo que puede explicar de manera plausible los mecanismos que asocian la inflamación crónica con la carcinogénesis del CCR (240).

Es de interés y probablemente la primera vez que se comunique la asociación encontrada entre la expresión de la SP a nivel nuclear y la inflamación peritumoral y la invasión perineural. En cuanto a la incidencia de invasión linfovascular e invasión perineural, cada vez con más interés en los estudios de investigación, tampoco observamos diferencias respecto a otras grandes series publicadas (241).

En nuestra muestra, no se ha demostrado que exista una relación estadísticamente significativa entre la expresión de la SP / NK1-R con el grado histológico, con el TNM ni con las metástasis a distancia lo que coincide con los resultados de Chen et al., pero no concuerdan con los resultados expresados por otros autores (149,242). Tampoco existe asociación con los niveles de CEA preoperatorios, ni con la presencia de IMS.

Las características histológicas de los tumores de los pacientes de nuestro estudio fueron similares a los datos publicados por Pedro M. Ruiz- López en la vía clínica del CCR en España (243). Del mismo modo, tampoco encontramos diferencias, en este aspecto, al comparar nuestros resultados con series americanas donde el estadio más frecuente es el pT3 y nosotros como ellos los G2 (244). La media de ganglios extirpados en nuestra muestra de pacientes fue de 13. Y al comparar estos datos con los obtenidos en el último estudio nacional y multicéntrico de pacientes intervenidos por CCR en los servicios de Cirugía General y Aparato Digestivo de distintas autonomías española, encontramos un resultado bastante diferente y favorable a nuestra muestra, ya que la media de ganglios analizados por el resto fue de 10.76 (IC del 95%: 9,12-12,41) (243). Pero todos estos resultados se encuentran lejanos de los descritos por los japoneses que, sin incluir “la linfadenectomía extensa”, encuentran una media de 31 ganglios en sus cirugías convencionales(245). Sin embargo, muchos grupos de expertos y para una correcta estadificación exigen un mínimo de 12 ganglios aislados para tumores CCR, exceptuando en los carcinomas de recto tratados con radioterapia donde el número de ganglios obtenidos es sensiblemente inferior.

La edad y el sexo han sido variables que han mostrado su influencia en la supervivencia global específica por cáncer en varios estudios y ambas variables forman parte de los nomogramas predictivos de supervivencia en pacientes con CCR desarrollados a partir de grandes grupos de pacientes procedentes de

ensayos clínicos y cohortes prospectivas. La edad parece tener una influencia favorable en las características clínico patológicas de los pacientes con CCR esporádico (246). En general, el sexo masculino se ha asociado a mayor incidencia y mortalidad por CCR. La mayoría de estudios encuentra mayor supervivencia en mujeres, (247) mientras que otros no encuentran diferencias. Existen varias hipótesis para explicar el efecto positivo del sexo femenino en la supervivencia CCR, como la influencia de las hormonas sexuales femeninas endógenas, la mayor participación de la mujer en el screening de CCR y la mayor tasa de morbilidad postoperatoria en varones que contribuye al aumento de la mortalidad en este grupo.

Estos resultados no concuerdan con los observados en el presente trabajo, ya que ni la edad se relacionaron con el pronóstico de los pacientes con CCR lo que coincide, con los obtenidos por Chen et al.(202) probablemente debido al pequeño tamaño muestral. En cambio, sí concuerdan con los resultados descritos en la literatura en relación al sexo ya que en nuestro trabajo disminuye la supervivencia libre de enfermedad a los 10 años en pacientes con sexo masculino.

En este sentido, hay que tener en cuenta que la mayoría de trabajos centrados en el análisis de variables clínicas tienen como objetivo el estudio de la SG, no la SGEC. Por otro lado, en la presente investigación hemos objetivado que la localización del tumor no influye en los resultados oncológicos a largo plazo. Estos resultados concuerdan con los publicados por Hansen et al.(248)

quienes realizaron una revisión sistemática y hallaron que la localización tumoral por sí misma no tenía una clara relación con el pronóstico. Sin embargo, la localización tumoral y su impacto en los resultados oncológicos sigue siendo tema de debate en especial tras la aparición de la nueva clasificación molecular y diferentes estudios han evidenciado que las neoplasias localizadas en el colon derecho presentaban una mayor tasa de mortalidad que las del colon izquierdo (249,250).

En nuestra muestra de estudio la SLE a los 5 años fue del 44,8 %. La tasa de recidiva sistémica durante el tiempo de seguimiento fue del 41,4%. El tiempo mediano (RIC) de recidiva fue de 45,0 (14.0 ; 106.0) meses. Pues bien, al comparar nuestra tasa de recidiva sistémica con la descrita en la literatura y en pacientes en el mismo estadio histológico, nos encontramos en una situación desfavorable ya que, según el último informe publicado por la ESMO el 20-25% de los pacientes sometidos a una cirugía potencialmente curativa y usando los regímenes actuales de quimioterapia desarrollaran metástasis a distancia. Nuestra tasa de recidiva local fue del 10,3% y la descrita en la literatura se sitúa en torno al 2.4%-18%. Esta variabilidad en la literatura puede deberse a diferencias en la definición de recidiva local, al tamaño de las muestras, a la disparidad en los tiempos de seguimiento, la cirugía de urgencia y las circunstancias relacionadas con el factor cirujano.

Respecto al estudio de la supervivencia, en el presente trabajo de investigación hemos establecido como objetivo la SGEC. La mayoría de trabajos

publicados en pacientes con CCR se centran en el estudio de la SG, medida que puede estar influida por la edad y las comorbilidades de los pacientes con CCR. En la presente serie la probabilidad de SGEC a los 5 años tras el diagnóstico, ha sido del 41,4 %. Al comparar nuestros resultados con los descritos en la literatura nos aparecen unos resultados más desfavorables. Según los últimos datos publicados por la Sociedad Americana sobre el Cáncer la SG a los 5 años se sitúa en torno al 65% y la SGEC en el 62.5%.

En el presente trabajo, para estudiar factores de riesgo independientes de SLE y SGEC realizamos inicialmente un análisis univariante de cada una de las variables clínicas, analíticas e histológicas recogidas del estudio descriptivo de nuestra población. A continuación, las variables con $p < 0.15$ en el análisis univariante fueron analizadas de forma conjunta en un estudio multivariante. En el presente trabajo de investigación, las variables relacionadas con la SLE en el análisis univariante fueron estadio pT y pN (TNM) la existencia de invasión linfocascular y perineural, el uso de quimioterapia adyuvante. Pues bien, tras el análisis multivariante, las que se mantuvieron como factores de riesgo independiente para la SLE fueron el estadio pT, la invasión perineural ($p = 0,007$, $HR = 2,47$; IC 95%: 1,8- 4,75); y el estadio pN (con un máximo en pN2 de $HR = 4,10$; IC95%: 1,87-9,01; $p = 0,007$) y el K-Ras.

El modelo de regresión de Cox utilizado para la SLE puso de manifiesto que la expresión de la SP a nivel nuclear disminuye la supervivencia en los casos en los que la expresión a nivel nuclear es más alta, existe infiltración perineural,

presencia de metástasis ganglionares y se expresa en oncogén K-Ras tanto en su forma nativa como en la mutada; incrementándose el índice de recurrencia de la enfermedad ante la presencia de cualquiera de estos parámetros.

En el 50% de los pacientes con CCR metastásico cuyos tumores expresaban K-Ras nativo las recidivas aparecían a los 11,7 meses mientras que en aquellos con K-Ras mutado aparecían a los 14,5 meses a diferencia que aquellos que inicialmente no tenían metástasis las presentan a los 54,1 meses.

Estos datos pueden estar explicados por la progresión neoplásica más agresiva de los tumores con K-Ras nativos. En la actualidad estos tumores se benefician de la posibilidad de administrar una terapia dirigida contra el factor de crecimiento endotelial (anti-EGFR) que logra incrementar la supervivencia mediana en nuestra serie hasta los 32,1 meses

Como sugieren Muñoz et al., la presencia del undecapéptido en el citoplasma de las células normales y tumorales sugiere que la SP puede estar involucrada en mecanismos autocrinos, paracrinos, endocrinos y nucleocrinos así como a nivel del sistema nervioso periférico y límbico (232).

Según concluyen trabajos realizados por el equipo de este mismo autor la presencia de NK1-R en las células tumorales puede deberse a que este receptor parece estar involucrado en la viabilidad de estas células. Por esta razón, las células tumorales sobreexpresan el NK1-R (207,232). Se sugiere que, en el interior de la masa tumoral, la SP podría liberarse al espacio extracelular y unirse

a los receptores NK1-R sobreexpresados en las células tumorales induciendo la proliferación y migración de las células tumorales, a este proceso le denominan Muñoz et al. como mecanismo autocrino (2,227,232).

En nuestro estudio los tumores con metástasis presentaban una sobreexpresión de los receptores NK1-R. En nuestro caso, no pudimos demostrar diferencias estadísticamente diferencias en la expresión inmunohistoquímica de SP.

La sobreexpresión del citado receptor, parece estar de acuerdo con estudios previos en los que SP, a través del receptor NK1-R, indujo la mitogénesis en un gran número de células tumorales humanas (232). La relación entre el cáncer y la inflamación se basa en la observación de que, con frecuencia, los tumores crecen sobre áreas de inflamación crónica y la presencia de células inflamatoria en biopsias de tumores (251). Está ampliamente aceptado que los mediadores de la inflamación y los efectores celulares constituyen una parte importante del microambiente tumoral (252).

La migración de células cancerosas, para invasión y metástasis, es un requisito previo para la progresión tumoral y, por esta razón, la formación de vesículas en la membrana es muy importante en la propagación y migración celular (253). Se sabe que la formación de vesículas en la membrana está mediada por el sistema del receptor SP/NK1-R (232).

Por lo tanto, la liberación de SP de las células tumorales podría inducir depresión porque el nivel plasmático de SP aumenta y este aumento podría desencadenar la progresión de las células tumorales y además estos niveles elevados en la sangre (232,254) produciendo depresión estableciendo una relación entre el sistema límbico (estrés emocional) y la progresión de la masa tumoral y viceversa. Además, el alto nivel de SP en la sangre podría estar relacionado con el prurito, ya que se sabe que SP induce prurito y que los antagonistas del receptor NK1-R mejoran el prurito (255). La desnutrición es uno de los estados finales de los pacientes con cáncer colorrectal. Esto podría explicarse por el efecto Warburg: las células cancerosas producen energía mediante una alta tasa de glucólisis seguida de fermentación de ácido láctico y, en este sentido, se sabe que las células tumorales en crecimiento tienen tasas glucolíticas hasta 200 veces más altas que las de sus tejidos normales de origen (256). SP, después de unirse al receptor NK1-R, provoca la descomposición del glucógeno en las células tumorales (257) y también se sabe que estas células sobreexpresan el receptor NK1-R en comparación con las células normales (232). Esto significa que la función glucolítica está vinculada a la cantidad de receptores NK1-R expresados por la célula. De esta manera, las células CCR producen degradación de glucógeno y aumentan su metabolismo debido a la alta tasa de glucosa obtenida y por lo tanto aumentan la masa tumoral, pero las células normales no pueden competir con las células tumorales porque las células normales expresan un número mucho menor de receptores NK1-R. La

masa tumoral produce altos niveles de SP que liberan al torrente sanguíneo comportándose como si fuera un órgano endocrino. Estos altos niveles de SP van a afectar a otros órganos produciéndose una comunicación (*cross-talk*) entre ellos esto podía explicar que la masa tumoral indujese síntomas propios del sistema límbico como son la ansiedad o la depresión a la par de producir dolor e inflamación.

Los hallazgos informados aquí con respecto a la participación del sistema de receptor SP/NK1-R en cáncer colorrectal están de acuerdo con estudios previos en los que se informó la presencia de fibras nerviosas que contienen SP en las células tumorales.

La presencia de SP en el citoplasma de las células tumorales podría ejercer una acción paracrina sobre las células endoteliales. Las últimas células expresan receptores NK1-R y el péptido puede inducir la proliferación de células endoteliales que favorecen la angiogénesis y la progresión de la masa tumoral (232). Además, la masa tumoral podría liberar SP en la sangre (mecanismo endocrino) y luego aumentaría el nivel plasmático de SP. Esto es importante, ya que, de esta manera, el aumento del nivel de SP podría inducir la aparición del síndrome paraneoplásico (trombosis, estrés emocional, prurito, desnutrición). En este sentido, se sabe que las plaquetas expresan receptores NK1-R, que SP induce trombosis y que los antagonistas del receptor NK1-R reducen la formación de trombos (258). Por lo tanto, la liberación de SP de la masa tumoral puede inducir trombofilia porque aumenta el riesgo de trombosis. Además, en el

sistema límbico, un aumento en el nivel de SP se ha relacionado con el estrés emocional (ansiedad y depresión) y se sabe que los antagonistas del receptor NK1-R podrían bloquear este efecto con los consiguientes efectos beneficiosos en el tratamiento (259).

Según Muñoz et al., la presencia de SP en los núcleos de las células tumorales puede significar que este péptido esté actuando como un factor epigenético, regulando la expresión génica. Se sabe que SP regula los factores de transcripción y los protooncogenes (p. Ej., NF-B, c-fos, c-jun, AP-1, factor inducible por la hipoxia (HIF-1), c-myc) que están implicados en la inflamación. (NF-kB), diferenciación celular (c-fos, c-jun, AP-1), angiogénesis (HIF-1) y en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular (c-myc) (151,232,260,261).

Además, se sabe que la SP ejerce su efecto solo una vez que está ligado a su receptor y ambos se encuentran en el núcleo de las células madre; la presencia de la SP en el núcleo de estas células podría estar involucrada en el comportamiento de las células madre. Hasta el momento la SP se consideraba una molécula de señalización celular en organismos multicelulares. Sin embargo, este hallazgo ayuda a la comprensión del papel de las células madre. Como la SP/NK1-R están el núcleo podrían actuar como una especie de rudimentario cerebro celular regulando la expresión génica (262).

El receptor NK1-R se expresa en la superficie de la célula, y cuando se une a SP, el complejo del ligando-receptor se internaliza a los endosomas dentro del citoplasma (263), modulando procesos celulares múltiples, incluyendo la neuromodulación y vasodilatación. Posteriormente, el complejo disocia por un lado la SP se degrada, y por otro el receptor NK1-R se sobreexpresa en la superficie celular. Trabajos recientes han demostrado que durante la infección temprana por el virus del varicela Zoster el receptor NK1-R comienza a acumularse en el núcleo de una manera asimétrica en asociación con la infección por el virus; durante la última fase de la infección, cuando el virus del Varicela Zoster se encuentra difusamente en la célula el NK1-R es predominante nuclear.(199) Puesto que el SP no fue estudiada en células infectada por el virus , la redistribución de NK1-R pueden inducir la SP como ligando vírico. El virus Varicela - Zoster mimetiza la acción de la SP. Con el uso de antagonistas del receptor NK1-R se podría impedir una de las vías de infección y replicación viral consiguiendo además evitar el efecto oncogénico asociado al virus. Este razonamiento podría además abrir futuras vías de estudio de la SP/NK1-R para otras familias de virus con demostrada capacidad oncogénica como son el virus de la hepatitis B en el hepatocarcinoma; el VEB (virus de Epstein-Barr) se asocia a Linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo; el virus HTLV-I se asocia a una forma de leucemia humana; el HHV8/KSHV es el responsable del sarcoma de Kaposi y el VPH (virus del papiloma humano) con cáncer de cérvix.

La localización intranuclear de NK1-R demostrada en las células cancerosas y en las stem cell adiposas (262), su significado fisiológico en esta localización aun no resulta claro aunque se ha especulado con que la SP podría regular la actividad nuclear de las células madre actuando como factor genético o epigenético regulando la expresión génica (262). En lo que respecta a la función epigenética se ha descrito que la SP induce la expresión de algunos genes a través de la histona acetilasa en las células epiteliales del colon(180,264). La mayor expresión en el núcleo de las células madre adiposas durante las mitosis sobre los niveles de las que no se dividen hacen pensar que los factores neurogénicos (SP) podrían regular el ciclo celular genético de las células madre. Todos estos recientes hallazgos podrían sugerir el papel del sistema SP/NK1-R en el citoplasma y en las funciones nucleares de las células madres como son la acción mitogénica, la diferenciación y la migración celular.

Ha quedado demostrado cómo los tejidos tumorales en el CCR estudiados expresan SP y NK1-R tanto en el en el componente glandular como en su periferia. Se ha demostrado por primera vez la asociación entre la expresión de la SP en las células tumorales del CCR con la inflamación peritumoral y la invasión perineural por lo que el uso de antagonistas podría tener un papel en este sentido. Uno de los principales objetivos en el tratamiento del cáncer colorrectal consiste en evitar la propagación de las células tumorales, disminuyendo por tanto el riesgo de aparición de metástasis. En este sentido, existen estudios (72,73) que trata de relacionar el desarrollo de metástasis con

la estimulación de ligandos que pueden inducir la migración celular entre ellos el NK1R. Uno de los resultados obtenidos es que en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-478 y la de próstata PC-3 se da el fenómeno de migración celular inducido por la noradrenalina, dopamina y la SP. Dicho fenómeno fue inhibido tras la aplicación de sus correspondientes antagonistas. Así pues, es posible que el complejo SP/NK1-R actúe permitiendo la migración celular y con ello el desarrollo de metástasis y por lo tanto de nuevo, el uso de antagonistas del receptor incrementaría su actividad.

Además, en nuestro estudio la expresión de NK1-R a nivel citoplasmático se asocia al desarrollo de metástasis pleuropulmonares, aunque nuestra muestra es pequeña se deberían de ampliar estudios en este sentido ya que se podrían utilizar los antagonistas en estadios IV de la enfermedad además del uso en el resto de estadios debido a todas las demás funciones del binomio SP/NK1-R ya descritas en el presente trabajo.

El uso de antagonistas del NK1-R bloquea la capacidad proliferativa. El hecho de que las células endoteliales estén invadas por fibras nerviosas de las paredes vasculares que contienen SP, sugiere que pueda existir al menos otra vía de inducción de la angiogénesis. Este documentado que esta innervación se encuentra aumentada en tejidos sometidos a inflamación crónica (265) que es especialmente evidente en CCR con IMS por lo tanto este grupo de carcinomas podrían responder mejor a la terapia dirigida con antagonistas del NK1-R.

Con el uso de antagonistas del receptor NK1-R se podría impedir una de las vías de infección y replicación viral consiguiendo además evitar el efecto oncogénico asociado al virus. Este razonamiento podría además abrir futuras vías de estudio de la SP/NK1-R para otras familias de virus con demostrada capacidad oncogénica como son el virus de la hepatitis B en el hepatocarcinoma; el VEB (virus de Epstein-Barr) se asocia a Linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo; el virus HTLV-I se asocia a una forma de leucemia humana; el HHV8/KSHV es el responsable del sarcoma de Kaposi y el VPH (virus del papiloma humano) con cáncer de cérvix.

6.1 LIMITACIONES Y SESGOS

Debido a las limitaciones asociadas al presupuesto asignado al proyecto tuvimos que decantarnos por realizar el estudio inmunohistoquímico mediante la realización de microarrays (TMA) en vez de sobre cortes tisulares completos. Esto puede llevarnos a un sesgo de selección ya que la heterogeneidad teórica del tejido tumoral puede estar infrarrepresentada.

Igualmente, el estroma subyacente con algunas de las características del tejido colorrectal, así como la cantidad de vasos o nervios pueden verse limitadas al no disponer de una sección completa del bloque.

Para minimizar estos sesgos se hizo una revisión histológica de todas las secciones representativas de cada una de las piezas estudiadas

seleccionándose para la más representativa para los estudios de *arrays* eligiendo un área con adecuado volumen tumoral alejada del margen para evitar artefactos quirúrgicos y de procesamiento y se incluyeron en la medida de lo posible áreas en las que el tejido tumoral y no tumoral estuvieran suficientemente representados. Esta revisión permitió la comprobación de los diagnósticos emitidos con anterioridad. Con el fin de disminuir la variabilidad asociada a la técnica quirúrgica, se seleccionaron casos realizados mediante la misma técnica (sigmoidectomías vía laparoscópica). Además, se seleccionaron los casos intervenidos por el mismo cirujano principal y ayudante.

Todas las piezas quirúrgicas fueron talladas macroscópicamente por los tres mismos patólogos que siguieron el protocolo normalizado de trabajo siguiendo las recomendaciones de la SEAP.

Se seleccionan los mejores cortes para la obtención del cilindro adecuado y realización del TMA comprobándose que coinciden con el área de interés a estudiar (con una sección de H/E) antes de realizar el estudio inmunohistoquímico.

El procesamiento de las muestras previo a la tinción de rutina con H-E (H/E) se realizó de manera automatizada mediante el instrumento Excelsior AS[®], asegurándonos así de reducir los sesgos asociados a variabilidad durante el procesamiento de fijación e inclusión en parafina. Los cortes de los bloques de parafina fueron realizados por el mismo técnico usando el mismo micrótopo

(Micron®, Leica) con un espesor de 5 micras. Una vez finalizada esta fase los patólogos (patólogos 1 y 2) que han ayudado a la realización de este estudio, revisaron los diagnósticos histológicos, seleccionaron, mediante consenso, los mejores cortes, y dentro de ellos las áreas de interés para construir los microarrays de tejido (TMA).

Una vez contruidos los microarrays con los cilindros seleccionados de tejido normal y tumoral se inició la siguiente fase, la tinción inmunohistoquímica. Previamente al procesamiento de tinción con anticuerpos, se hizo un control con H-E para comprobar la calidad de las muestras tisulares.

El procesamiento de la técnica inmunohistoquímica que se realizó de asimismo de forma automatizada mediante el instrumentó Benchmark XT® por lo que se intentaron disminuir los sesgos debidos a la variabilidad del proceso de inmunotinción incluyéndose controles internos positivos para comprobar la idoneidad de la técnica inmunohistoquímica. Además, en todos los casos observamos que el patrón de inmunorreactividad tanto de la SP como del NK1-R se circunscribe y coincide con estructuras anatómicas e histológicas, a diferencia de lo que ocurre con las muestras artefactadas.

Todo esto nos sirve como validación para poder afirmar que los resultados de la expresión inmunohistoquímica reflejan la existencia real en dichos tejidos tanto de la SP como del NK1-R.

El empleo de la escala de *Allred Unit Scoring*, para la valoración de la extensión e intensidad de la inmunorreactividad permitió homogeneizar y objetivar en mayor medida los resultados obtenidos entre los diferentes casos de estudio.

La demostración de la expresión tanto de la SP como del NK1-R en el tejido colorrectal sano establece las bases para profundizar en la comprensión de la fisiología y ampliar las funciones a la fisiopatología del CCR orientando a un nuevo abordaje terapéutico de este tipo de tumores basado en el bloqueo del NK1-R a través de sus antagonistas específicos.

La evaluación de la expresión inmunohistoquímica se realizó mediante la revisión por pares cegada. En caso de discordancia fueron los directores de la tesis Dr. Muñoz y Dr. Segura expertos en el material quienes resolvieron la disensión.

6.2 INVESTIGACIONES FUTURAS RELACIONADAS CON LOS ANTAGONISTAS DEL NK1-R

A pesar los resultados obtenidos, todavía queda mucho por hacer para poder considerar a este grupo de fármacos como una alternativa real para el tratamiento del cáncer. Quedan pendientes ciertos puntos a investigar en relación con los antagonistas del NK1-R:

- Seguir investigando la acción in vitro de los antagonistas del NK1-R en otras líneas celulares tumorales y con otros fármacos.
- Ampliar las investigaciones in vivo en animales de investigación entre ellos por ejemplo el uso de ratones “desnudos “.
- Llevar a cabo Ensayos Clínicos con los fármacos antagonistas del NK1-R aprobados por la Agencia Europea del Medicamento para demostrar la posible eficacia antitumoral en los tumores donde se ha demostrado la presencia de SP/NK1-R.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

1. Confirmamos la expresión de SP y NK1-R en el carcinoma colorrectal.
2. Se encuentran relaciones estadísticamente significativas entre la expresión de SP / NK1-R y la inflamación peritumoral, la invasión perineural y la recurrencia (recidiva local o metástasis).
3. No todos los factores pronósticos establecidos en la literatura tuvieron valor pronóstico en nuestros pacientes. Los factores pronósticos independientes de SLE a los 10 años fueron la infiltración perineural, pT(\leq pT3/pT4), K-Ras nativo / mutado y el tratamiento con QT
4. La supervivencia global específica del cáncer SGEC a los 10 años está relacionada de manera significativa con la expresión de SP en el citoplasma de las células tumorales, la recurrencia y la expresión de Kras nativo.
5. La expresión de SP/NK1-R sirve como probable biomarcador diagnóstico y terapéutico para el uso de antagonistas específicos para NK1-R.
6. La presencia de SP/NK1-R en las células del CCR ayudan a una mejor comprensión de dicha patología tumoral.

7. Se hace necesario diseñar estudios prospectivos con muestras más amplias con el fin de identificar el papel del binomio SP/NK1-R en SLE y SGEC y respuesta a las terapias, así como el uso de los antagonistas del receptor NK1-R en pacientes con CCR.

Aportaciones de esta tesis al conocimiento sobre el Cáncer Colorrectal y el abordaje clínico-terapéutico:

- Se ha confirmado la expresión de SP / NK1-R en el Cáncer Colorrectal.
- La presencia de SP/NK1R es un factor de riesgo de progresión, recidiva y metástasis del Cáncer Colorrectal.
- Sería conveniente evaluar la eficacia y efectividad del uso de antagonistas específicos para NK1-R para el tratamiento del Cáncer Colorrectal.

BIBLIOGRAFÍA

8 **BIBLIOGRAFÍA**

1. Muñoz M, Coveñas R. Substance P, the NK-1 Receptor and NK-1 Receptor Antagonist in cancer treatment. In: Atta-ur-Rahman, Choudhary MI, editors. *Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery*. Oak Park (IL), USA: Bentham Science Publishers; 2014. p. 3–38.
2. Rosso M, Robles-Frias MJ, Covenas R, Salinas-Martin M V, Munoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol*. 2008/09/11. 2008;29(4):245–54.
3. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*. 2001 Jun;61(11):4545–9.
4. Church D, Midgley R, Kerr D. Biomarkers in early-stage colorectal cancer: ready for prime time? *Dig Dis*. 2012;30 Suppl 2:27–33.
5. Jeffus S. Book Review *Histology for Pathologists*, 4th Edition [Internet]. Vol. 38, *AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY*. 2014. p. 582. Available from: http://explore.bl.uk/primo_library/libweb/action/display.do?tabs=detailsTab&gathStatTab=true&ct=display&fn=search&doc=ETOCRN613373549&indx=1&recl ds=ETOCRN349921016
6. Floch MH. Capítulo 120 - Estructura e histología del colon. In: Floch MHBT-NG, editor. Barcelona: Elsevier España; 2006. p. 396–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978844581567050120X>
7. Symonds DA. Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum. *Arch Pathol*. 1974 Jun;97(6):343–7.
8. Nikolaou S, Qiu S, Fiorentino F, Rasheed S, Tekkis P, Kontovounisios C. Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer. *Tech Coloproctol*. 2018 Jul;
9. Whitlock E, Lin J, Liles E, Beil T, Fu R. Screening for colorectal cancer: A targeted, updated systematic review for the u.s. preventive services task force. *Ann Intern Med* [Internet]. 2008 Nov 4;149(9):638–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-149-9-200811040-00245>
10. Pellise M. [Colonoscopy in the screening, follow-up and treatment of colorectal cancer and precursor lesions]. *Gastroenterol Hepatol*. 2015 Sep;38 Suppl 1:71–7.

11. Taylor SA, Laghi A, Lefere P, Halligan S, Stoker J. European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR): consensus statement on CT colonography. *Eur Radiol*. 2007 Feb;17(2):575–9.
12. Koh J-L, Yan TD, Glenn D, Morris DL. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol*. 2009 Feb;16(2):327–33.
13. Nordholm-Carstensen A, Wille-Jorgensen PA, Jorgensen LN, Harling H. Indeterminate pulmonary nodules at colorectal cancer staging: a systematic review of predictive parameters for malignancy. *Ann Surg Oncol*. 2013 Nov;20(12):4022–30.
14. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, Beyene J, Victor JC, Schmocker S, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul;19(7):2212–23.
15. Whitlock EP, Lin J, Liles E, Beil T, Fu R, O'Connor E, et al. No Title. Rockville (MD); 2008.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
17. Benard F, Barkun AN, Martel M, von Renteln D. Systematic review of colorectal cancer screening guidelines for average-risk adults: Summarizing the current global recommendations. *World J Gastroenterol*. 2018 Jan;24(1):124–38.
18. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Apr;93(8):583–96.
19. Beaton C, Twine CP, Williams GL, Radcliffe AG. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2013 Jul;15(7):788–97.
20. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Vol. 50, *Histopathology*. 2007. p. 113–30.
21. Pisano M, Zorcolo L, Merli C, Cimbanassi S, Poiasina E, Ceresoli M, et al. 2017 WSES guidelines on colon and rectal cancer emergencies: obstruction and perforation. *World J Emerg Surg*. 2018;13:36.
22. Reza MsJCC, Pin MsJWB. Cáncer de colon, secuencia adenoma carcinoma y pólipo aserrado [Internet]. Vol. 14, *Revista Conrado*, Vol 14, Iss 62, Pp 51-55 (2018). 2018. p. 51–5. Available from: <https://doaj.org/article/fafe6c9eca404a6b90ea7aaf75e76786>
23. Chetty R, Bateman AC, Torlakovic E, Wang LM, Gill P, Al-Badri A, et al. A

- pathologist's survey on the reporting of sessile serrated adenomas/polyps. *J Clin Pathol*. 2014 May;67(5):426–30.
24. Vaquero L, Jorquera F. Novedades en el cáncer colorrectal hereditario. *Gastroenterol Hepatol*. 2018;41(3):78–85.
 25. Le S, Ansari U, Mumtaz A, Malik K, Patel P, Doyle A, et al. Lynch Syndrome and Muir-Torre Syndrome: An update and review on the genetics, epidemiology, and management of two related disorders. *Dermatol Online J*. 2017 Nov;23(11).
 26. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology*. 1997 Apr;112(4):1096–102.
 27. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, Shepherd NA, Yantiss RK. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013 Aug;37(8):1252–8.
 28. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. Vol. 67, *CA: a cancer journal for clinicians*. United States; 2017. p. 93–9.
 29. Chandler I, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers-findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology*. 2008 Mar;52(4):494–9.
 30. Luchini C, Nottage A, Pea A, Solmi M, Stubbs B, Capelli P, et al. Significance of the prognostic stratification of extranodal extension in colorectal cancer. Vol. 27, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. England; 2016. p. 1647.
 31. Sargent DJ, Shi Q, Gill S, Louvet C, Everson RB, Kellner U, et al. Molecular testing for lymph node metastases as a determinant of colon cancer recurrence: results from a retrospective multicenter study. *Clin Cancer Res*. 2014 Aug;20(16):4361–9.
 32. Mescoli C, Albertoni L, Pucciarelli S, Giacomelli L, Russo VM, Fassan M, et al. Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Mar;30(9):965–71.
 33. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):979–94.
 34. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T

- cell responses. *Immunity*. 2007 Jul;27(1):111–22.
35. Ortiz H, Codina A. Rectal cancer project of the Spanish Association of Surgeons (Viking project): Past and future. Vol. 94, *Cirugia espanola*. Spain; 2016. p. 63–4.
 36. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline Summary From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *J Oncol Pract*. 2017 May;13(5):333–7.
 37. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(5):1204–1225.e12.
 38. Ahadova A, Gallon R, Gebert J, Ballhausen A, Endris V, Kirchner M, et al. Three molecular pathways model colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome. *Int J cancer*. 2018 Feb;
 39. Puccini A, Berger MD, Naseem M, Tokunaga R, Battaglin F, Cao S, et al. Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Dec;1868(2):439–48.
 40. Zhao Y, Ando K, Oki E, Ikawa-Yoshida A, Ida S, Kimura Y, et al. Aberrations of BUBR1 and TP53 gene mutually associated with chromosomal instability in human colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2014 Oct;34(10):5421–7.
 41. Copija A, Waniczek D, Witkos A, Walkiewicz K, Nowakowska-Zajdel E. Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan;18(1).
 42. Chan DLH, Segelov E, Wong RS, Smith A, Herbertson RA, Li BT, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer. *Cochrane database Syst Rev*. 2017 Jun;6:CD007047.
 43. Jakubowska K, Kisielewski W, Kanczuga-Koda L, Koda M, Famulski W. Stromal and intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):6421–32.
 44. Marisa L, de Reynies A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013;10(5):e1001453.
 45. Wilson MJ, van Haaren M, Harlaar JJ, Park HC, Bonjer HJ, Jeekel J, et al. Long-term prognostic value of preoperative anemia in patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol*. 2017 Mar;26(1):96–104.
 46. Mills KT, Bellows CF, Hoffman AE, Kelly TN, Gagliardi G. Diabetes mellitus and

- colorectal cancer prognosis: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2013 Nov;56(11):1304–19.
47. Walker KG, Bell SW, Rickard MJFX, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2004 Aug;240(2):255–9.
48. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009;214(9–10):761–77.
49. Haram A, Boland MR, Kelly ME, Bolger JC, Waldron RM, Kerin MJ. The prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: A systematic review. *J Surg Oncol*. 2017 Mar;115(4):470–9.
50. Zhao J-M, Wang Y-H, Yao N, Wei K-K, Jiang L, Hanif S, et al. Poor Prognosis Significance of Pretreatment Thrombocytosis in Patients with Colorectal Cancer: a Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(9):4295–300.
51. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*. 2007 May;8(5):341–52.
52. Caplin S, Cerottini JP, Bosman FT, Constanda MT, Givel JC. For patients with Dukes' B (TNM Stage II) colorectal carcinoma, examination of six or fewer lymph nodes is related to poor prognosis. *Cancer*. 1998 Aug;83(4):666–72.
53. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2828–35.
54. Mahar AL, Compton C, Halabi S, Hess KR, Weiser MR, Groome PA. Personalizing prognosis in colorectal cancer: A systematic review of the quality and nature of clinical prognostic tools for survival outcomes. *J Surg Oncol*. 2017 Dec;116(8):969–82.
55. Maurel J, Gravalos C, Rivera F, Vera R, Gonzalez Flores E. SEOM clinical guidelines for the adjuvant treatment of colorectal cancer 2013. *Clin Transl Oncol*. 2013 Dec;15(12):991–5.
56. Kerr RS, Love S, Segelov E, Johnstone E, Falcon B, Hewett P, et al. Adjuvant capecitabine plus bevacizumab versus capecitabine alone in patients with colorectal cancer (QUASAR 2): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Nov;17(11):1543–57.
57. Oweira H, Giryes A, Mannhart M, Decker M, Abdel-Rahman O. Impact of Time to Start Systemic Therapy on the Outcomes of Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with First Line FOLFOX Chemotherapy; a Patient-Level Pooled

- Analysis of Two Clinical Trials. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Aug;1–6.
58. Meyerhardt JA, Mangu PB, Flynn PJ, Korde L, Loprinzi CL, Minsky BD, et al. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol*. 2013 Dec;31(35):4465–70.
 59. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol*. 2015 Jun;33(16):1787–96.
 60. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras de cáncer en España [Internet]. Madrid: SEOM; 2018. 24 p. Available from: http://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf
 61. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Apr;29(4):1016–22.
 62. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thome SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol*. 2004 May;22(10):1797–806.
 63. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):7–30.
 64. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53916.
 65. Neuman HB, O'Connor ES, Weiss J, Loconte NK, Greenblatt DY, Greenberg CC, et al. Surgical treatment of colon cancer in patients aged 80 years and older: analysis of 31,574 patients in the SEER-Medicare database. *Cancer*. 2013 Feb;119(3):639–47.
 66. Danielsen AK, Burcharth J, Rosenberg J. Patient education has a positive effect in patients with a stoma: a systematic review. *Colorectal Dis*. 2013 Jun;15(6):e276–83.
 67. Abraha I, Cozzolino F, Orso M, Marchesi M, Germani A, Lombardo G, et al. A systematic review found that deviations from intention-to-treat are common in randomized trials and systematic reviews. *J Clin Epidemiol*. 2017 Apr;84:37–46.
 68. Backman LJ, Fong G, Andersson G, Scott A, Danielson P. Substance P is a mechanoresponsive, autocrine regulator of human tenocyte proliferation. *PLoS One*. 2011;6(11):e27209.
 69. Zhang H, Cang C-L, Kawasaki Y, Liang L-L, Zhang Y-Q, Ji R-R, et al. Neurokinin-1

- hr/>
- receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci*. 2007 Oct;27(44):12067–77.
70. Kim S, Piao J, Son Y, Hong HS. Substance P enhances proliferation and paracrine potential of adipose-derived stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar;485(1):131–7.
71. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Nov;73(22):4249–64.
72. Garcia-Recio S, Gascon P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *Biomed Res Int*. 2015;2015:495704.
73. Navarro G, Franco N, Martinez-Pinilla E, Franco R. The Epigenetic Cytocrin Pathway to the Nucleus. Epigenetic Factors, Epigenetic Mediators, and Epigenetic Traits. A Biochemist Perspective. *Front Genet*. 2017;8:179.
74. Radulescu RT. From insulin, retinoblastoma protein and the insulin receptor to a new model on growth factor specificity: the nucleocrine pathway. *J Endocrinol*. 1995 Sep;146(3):365–8.
75. Radulescu RT. The nucleocrine pathway comes of age. *Rom J Morphol Embryol = Rev Roum Morphol Embryol*. 2015;56(2):343–8.
76. Bustamante Zuleta E. El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano. Medellín (Colombia): Universidad de Antioquia; 2007.
77. Hokfelt T, Lundberg JM, Schultzberg M, Johansson O, Skirboll L, Anggard A, et al. Cellular localization of peptides in neural structures. *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci*. 1980 Oct;210(1178):63–77.
78. Ceballos M. Péptidos y neurotransmisores. In: Andreu, D; Rivas L, editor. Péptidos en Biología y Biomedicina. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC; 1977. p. 463–78.
79. Russo AF. Overview of Neuropeptides: Awakening the Senses? Headache. 2017 May;57 Suppl 2:37–46.
80. Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*. 1987 Oct;329(6142):836–8.
81. Metwali A, Blum AM, Elliott DE, Setiawan T, Weinstock J V. Cutting edge: hemokinin has substance P-like function and expression in inflammation. *J Immunol*. 2004 Jun;172(11):6528–32.
82. Brown ER, Roth KA, Krause JE. Substance P is distributed between somatotrophs and thyrotrophs in a sexually dimorphic manner in rat. *Ann N Y Acad Sci*.

- 1991;632:366–9.
83. Patak E, Pinto FM, Story ME, Pintado CO, Fleming A, Page NM, et al. Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 2005 May;72(5):1125–33.
 84. Maggio JE. Tachykinins. *Annu Rev Neurosci.* 1988;11:13–28.
 85. Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, Nakanishi S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci.* 1984 Mar;34(12):1153–60.
 86. Kage R, McGregor GP, Thim L, Conlon JM. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem.* 1988 May;50(5):1412–7.
 87. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, et al. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene.* 2002 Aug;296(1–2):205–12.
 88. Erspamer V, Ronzoni G, Falconieri Erspamer G. Effects of active peptides on the isolated muscle of the human urinary bladder. *Invest Urol.* 1981 Jan;18(4):302–4.
 89. Cascieri MA, Huang RR, Fong TM, Cheung AH, Sadowski S, Ber E, et al. Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol.* 1992 Jun;41(6):1096–9.
 90. Fedi V, Altamura M, Balacco G, Canfarini F, Criscuoli M, Giannotti D, et al. Insertion of an aspartic acid moiety into cyclic pseudopeptides: synthesis and biological characterization of potent antagonists for the human Tachykinin NK-2 receptor. *J Med Chem.* 2004 Dec;47(27):6935–47.
 91. Harmar AJ, Hyde V, Chapman K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett.* 1990 Nov;275(1–2):22–4.
 92. Kage R, Thim L, Creutzfeldt W, Conlon JM. Post-translational processing of preprotachykinins. Isolation of protachykinin-(1-37)-peptide from human adrenal-medullary pheochromocytoma tissue. *Biochem J.* 1988 Jul;253(1):203–7.
 93. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martin JD, et al. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem.* 2004 Aug;11(15):2045–81.
 94. Hokfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med.* 2001 Jan;249(1):27–40.

95. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Jul;61(13):1652–63.
96. Lang S, Sperk G. Neurochemical characterization of preprotachykinin B(50-79) immunoreactivity in the rat. *Regul Pept.* 1995 May;57(2):183–92.
97. Moussaoui SM, Hermans E, Mathieu AM, Bonici B, Clerc F, Guinet F, et al. Polyclonal antibodies against the rat NK1 receptor: characterization and localization in the spinal cord. *Neuroreport.* 1992 Dec;3(12):1073–6.
98. Page NM, Weston-Bell NJ. Immunochemical methods for the peptidomic analysis of tachykinin peptides and their precursors. *Methods Mol Biol.* 2010;615:293–312.
99. Buell G, Schulz MF, Arkinstall SJ, Maury K, Missotten M, Adami N, et al. Molecular characterisation, expression and localisation of human neurokinin-3 receptor. *FEBS Lett.* 1992 Mar;299(1):90–5.
100. Huang RR, Yu H, Strader CD, Fong TM. Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry.* 1994 Mar;33(10):3007–13.
101. Zagorodnyuk V, Santicioli P, Maggi CA. Tachykinin NK1 but not NK2 receptors mediate non-cholinergic excitatory junction potentials in the circular muscle of guinea-pig colon. *Br J Pharmacol.* 1993 Oct;110(2):795–803.
102. Betancur C, Azzi M, Rostene W. Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Oct;18(10):372–86.
103. Harrison S, Geppetti P. Substance p. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jun;33(6):555–76.
104. Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur J Biochem.* 1990 Nov;193(3):751–7.
105. Werge TM. Identification of an epitope in the substance P receptor important for recognition of the common carboxyl-terminal tachykinin sequence. *J Biol Chem.* 1994 Sep;269(35):22054–8.
106. Macdonald SG, Dumas JJ, Boyd ND. Chemical cross-linking of the substance P (NK-1) receptor to the alpha subunits of the G proteins Gq and G11. *Biochemistry.* 1996 Mar;35(9):2909–16.
107. Gether U, Johansen TE, Snider RM, Lowe JA 3rd, Nakanishi S, Schwartz TW. Different binding epitopes on the NK1 receptor for substance P and non-peptide antagonist. *Nature.* 1993 Mar;362(6418):345–8.
108. Bobryshev Y V. Subset of cells immunopositive for neurokinin-1 receptor

- identified as arterial interstitial cells of Cajal in human large arteries. *Cell Tissue Res.* 2005 Jul;321(1):45–55.
109. Persson-Sjogren S, Lejon K, Holmberg D, Forsgren S. Expression of the NK-1 receptor on islet cells and invading immune cells in the non-obese diabetic mouse. *J Autoimmun.* 2005 Jun;24(4):269–79.
 110. Lai J-P, Douglas SD, Wang Y-J, Ho W-Z. Real-time reverse transcription-PCR quantitation of substance P receptor (NK-1R) mRNA. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Apr;12(4):537–41.
 111. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther.* 1997;73(3):173–217.
 112. Chapman RW, Hey JA, McLeod R, Minnicozzi M, Rizzo C. Tachykinins in the lungs. *Drug News Perspect.* 1998 Oct;11(8):480–9.
 113. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol.* 1990 May;100(1):11–4.
 114. Patak E, Canden ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martin JD, et al. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol.* 2003 Jun;139(3):523–32.
 115. Payan DG, McGillis JP, Organist ML. Binding characteristics and affinity labeling of protein constituents of the human IM-9 lymphoblast receptor for substance P. *J Biol Chem.* 1986 Oct;261(30):14321–9.
 116. McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;594:85–94.
 117. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande S V, Wang L, et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest.* 2003/05/15. 2003;83(5):731–42.
 118. Munoz M, Rosso M, Perez A, Covenas R, Rosso R, Zamarriego C, et al. The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides.* 2005/06/09. 2005;39(4):427–32.
 119. Munoz M, Rosso M, Aguilar FJ, Gonzalez-Moles MA, Redondo M, Esteban F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEp-2. *Invest New Drugs.* 2007/10/02. 2008;26(2):111–8.
 120. Munoz M, Rosso M, Carranza A, Covenas R. Increased nuclear localization of substance P in human gastric tumor cells. *Acta Histochem.* 2017/03/23.

- 2017;119(3):337–42.
121. Jenkinson KM, Mann PT, Southwell BR, Furness JB. Independent endocytosis of the NK(1) and NK(3) tachykinin receptors in neurons of the rat myenteric plexus. *Neuroscience*. 2000;100(1):191–9.
 122. Portbury AL, Furness JB, Southwell BR, Wong H, Walsh JH, Bunnett NW. Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*. 1996 Dec;286(3):281–92.
 123. Feher E, Pongor E, Altdorfer K, Kobori L, Lengyel G. Neuroimmunomodulation in human autoimmune liver disease. *Cell Tissue Res*. 2013/07/25. 2013;354(2):543–50.
 124. Lomax AE, Bertrand PP, Furness JB. Identification of the populations of enteric neurons that have NK1 tachykinin receptors in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res*. 1998 Oct;294(1):27–33.
 125. Lavin ST, Southwell BR, Murphy R, Jenkinson KM, Furness JB. Activation of neurokinin 1 receptors on interstitial cells of Cajal of the guinea-pig small intestine by substance P. *Histochem Cell Biol*. 1998 Sep;110(3):263–71.
 126. Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Sep;281(3):G602–11.
 127. Southwell BR, Furness JB. Immunohistochemical demonstration of the NK(1) tachykinin receptor on muscle and epithelia in guinea pig intestine. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1140–51.
 128. Fausson-Pellegrini M-S, Vannucchi M-G. Substance P and Neurokinin 1 receptor - expression is affected in the ileum of mice with mutation in the W locus. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):511–8.
 129. Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1088:23–40.
 130. Goode T, O'Connell J, Anton P, Wong H, Reeve J, O'Sullivan GC, et al. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut*. 2000 Sep;47(3):387–96.
 131. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol*. 1971 Jul;232(29):86–7.
 132. Tregear GW, Niall HD, Potts JTJ, Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nat New Biol*. 1971 Jul;232(29):87–9.
 133. Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P. Receptors for substance P and

- related neurokinins. *Pharmacology*. 1989;38(1):1–15.
134. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev*. 1983 Jun;35(2):85–141.
 135. Zimmer G, Rohn M, McGregor GP, Schemann M, Conzelmann K-K, Herrler G. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem*. 2003 Nov;278(47):46854–61.
 136. Munoz M, Carranza A, Pavon A, Anderson G, Covenas R. Immunolocalization of substance P and NK-1 receptor in Hofbauer cells in human normal placenta. *Microsc Res Tech*. 2013/10/25. 2013;76(12):1310–3.
 137. Munoz M, Pavon A, Rosso M, Salinas M V, Perez A, Carranza A, et al. Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta. *Placenta*. 2010/05/01. 2010;31(7):649–51.
 138. Skirboll L, Hokfelt T, Rehfeld J, Cuellar AC, Dockray G. Coexistence of substance P- and cholecystokinin-like immunoreactivity in neurons of the mesencephalic periaqueductal central gray. *Neurosci Lett*. 1982 Jan;28(1):35–9.
 139. Mantyh PW, Hunt SP, Maggio JE. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res*. 1984 Jul;307(1–2):147–65.
 140. Cuellar AC, Jessell TM, Kanazawa I, Iversen LL. Substance P: localization in synaptic vesicles in rat central nervous system. *J Neurochem*. 1977 Oct;29(4):747–51.
 141. Henry JL. Substance P and inflammatory pain: potential of substance P antagonists as analgesics. *Agents Actions Suppl*. 1993;41:75–87.
 142. Camras CB, Bito LZ. The pathophysiological effects of nitrogen mustard on the rabbit eye. II. The inhibition of the initial hypertensive phase by capsaicin and the apparent role of substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980 Apr;19(4):423–8.
 143. Jiang Z, Dun NJ, Karczmar AG. Substance P: a putative sensory transmitter in mammalian autonomic ganglia. *Science*. 1982 Aug;217(4561):739–41.
 144. Kessler JA, Black IB. Regulation of substance P in adult rat sympathetic ganglia. *Brain Res*. 1982 Feb;234(1):182–7.
 145. Keast JR, Furness JB, Costa M. Distribution of peptide-containing neurons and endocrine cells in the rabbit gastrointestinal tract, with particular reference to the mucosa. *Cell Tissue Res*. 1987 Jun;248(3):565–77.
 146. Furness JB, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL. Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience*. 1982 Feb;7(2):447–59.

147. Dodd S, Boulton DW, Burrows GD, De Vane CL, Norman TR. In vitro metabolism of mirtazapine enantiomers by human cytochrome P450 enzymes. *Hum Psychopharmacol*. 2001 Oct;16(7):541–4.
148. Esteban F, Munoz M, Gonzalez-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*. 2006/05/09. 2006;25(1):137–45.
149. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J cancer*. 1995 Jun;61(6):786–92.
150. Allen JM, Bloom SR. Neuropeptides in the brain. *Brain Dev*. 1985;7(6):568–72.
151. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res*. 1996 Nov;56(21):4983–91.
152. Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer*. 1999 Jan;79(2):236–43.
153. Munoz M, Perez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res*. 2004/06/05. 2004;14(3):183–8.
154. Munoz M, Rosso M, Covenas R, Montero I, Gonzalez-Moles MA, Robles MJ. Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonist, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007/05/26. 2007;48(6):2775–81.
155. Esteban F, Gonzalez-Moles MA, Castro D, Martin-Jaen Mdel M, Redondo M, Ruiz-Avila I, et al. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*. 2009/02/12. 2009;54(2):258–60.
156. Feistritz C, Clausen J, Sturn DH, Djanani A, Gunsilius E, Wiedermann CJ, et al. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pept*. 2003 Nov;116(1–3):119–26.
157. Pascual DW, McGhee JR, Kiyono H, Bost KL. Neuroimmune modulation of lymphocyte function--I. Substance P enhances immunoglobulin synthesis in lipopolysaccharide activated murine splenic B cell cultures. *Int Immunol*. 1991 Dec;3(12):1223–9.
158. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes

- by substance P. *J Immunol.* 1983 Oct;131(4):1613–5.
159. Krause JE, Takeda Y, Hershey AD. Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *J Invest Dermatol.* 1992 Jun;98(6 Suppl):2S–7S.
 160. Weinstock J V, Blum A, Walder J, Walder R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansonii produce substance P. *J Immunol.* 1988 Aug;141(3):961–6.
 161. Page NM, Dakour J, Morrish DW. Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006 Jul;12(7):427–33.
 162. Lembeck F. The 1988 Ulf Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. *Acta Physiol Scand.* 1988 Aug;133(4):435–54.
 163. Sutcliffe S, Platz EA. Inflammation in the etiology of prostate cancer: An epidemiologic perspective. *Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet].* 2007;25(3):242–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143906002316>
 164. Calvo CF, Chavanel G, Senik A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J Immunol.* 1992 Jun;148(11):3498–504.
 165. Gitter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol.* 1994 Apr;51(1):101–8.
 166. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science.* 1988 Sep;241(4870):1218–21.
 167. Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol.* 1997 Nov;159(10):4952–8.
 168. Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, Cruwys SC, Walsh DA. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jul;306(1):8–12.
 169. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, et al. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan;97(1):388–93.
 170. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther.* 1997;73(3):219–63.

171. Grider JR. Tachykinins as transmitters of ascending contractile component of the peristaltic reflex. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 1):G709-14.
172. Mantyh CR, Pappas TN, Lapp JA, Washington MK, Neville LM, Ghilardi JR, et al. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. *Gastroenterology*. 1996 Nov;111(5):1272–80.
173. Kincy-Cain T, Bost KL. Increased susceptibility of mice to *Salmonella* infection following in vivo treatment with the substance P antagonist, spantide II. *J Immunol*. 1996 Jul;157(1):255–64.
174. Arsenescu R, Blum AM, Metwali A, Elliott DE, Weinstock J V. IL-12 induction of mRNA encoding substance P in murine macrophages from the spleen and sites of inflammation. *J Immunol*. 2005 Apr;174(7):3906–11.
175. Koon H-W, Zhao D, Zhan Y, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb;104(6):2013–8.
176. Satheeshkumar PS, Mohan MP. Tachykinin Peptide, substance p, and its receptor have a significant role in tissue reactions induced by cytotoxic therapy. Vol. 59, *Digestive diseases and sciences*. United States; 2014. p. 2600–1.
177. De Felipe C, Pinnock RD, Hunt SP. Modulation of chemotropism in the developing spinal cord by substance P. *Science*. 1995 Feb;267(5199):899–902.
178. Kovsca Janjatovic A, Valpotic H, Kezic D, Lackovic G, Gregorovic G, Sladoljev S, et al. Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development. *Eur J Histochem*. 2012 Sep;56(3):e30.
179. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Dec;1643(1–3):75–83.
180. Koon H-W, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Sep;314(3):1393–400.
181. Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A, Liu J, Wang C-C, Mykoniatis A, et al. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-kappa B site on its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar;100(5):2957–62.
182. Stucchi AF, Shebani KO, Leeman SE, Wang C-C, Reed KL, Fruin AB, et al. A neurokinin 1 receptor antagonist reduces an ongoing ileal pouch inflammation and the response to a subsequent inflammatory stimulus. *Am J Physiol*

- Gastrointest Liver Physiol. 2003 Dec;285(6):G1259-67.
183. Douglas SD, Ho WZ, Gettes DR, Cnaan A, Zhao H, Leserman J, et al. Elevated substance P levels in HIV-infected men. *AIDS*. 2001 Oct;15(15):2043–5.
 184. Douglas SD, Cnaan A, Lynch KG, Benton T, Zhao H, Gettes DR, et al. Elevated substance P levels in HIV-infected women in comparison to HIV-negative women. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Mar;24(3):375–8.
 185. Lai JP, Ho WZ, Zhan GX, Yi Y, Collman RG, Douglas SD. Substance P antagonist (CP-96,345) inhibits HIV-1 replication in human mononuclear phagocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar;98(7):3970–5.
 186. Tebas P, Spitsin S, Barrett JS, Tuluc F, Elci O, Korelitz JJ, et al. Reduction of soluble CD163, substance P, programmed death 1 and inflammatory markers: phase 1B trial of aprepitant in HIV-1-infected adults. *AIDS*. 2015 May;29(8):931–9.
 187. Wang X, Douglas SD, Lai J-P, Tuluc F, Tebas P, Ho W-Z. Neurokinin-1 receptor antagonist (aprepitant) inhibits drug-resistant HIV-1 infection of macrophages in vitro. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007 Mar;2(1):42–8.
 188. Hegde A, Koh Y-H, Moochhala SM, Bhatia M. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment in polymicrobial sepsis: molecular insights. *Int J Inflam*. 2010 Sep;2010:601098.
 189. Hegde A, Zhang H, Moochhala SM, Bhatia M. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007 Sep;82(3):678–85.
 190. Puneet P, Hegde A, Ng SW, Lau HY, Lu J, Moochhala SM, et al. Preprotachykinin-A gene products are key mediators of lung injury in polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 2006 Mar;176(6):3813–20.
 191. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):211–23.
 192. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaller HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):201.
 193. Giardina GAM, Gagliardi S, Martinelli M. Antagonists at the neurokinin receptors-recent patent literature. *IDrugs*. 2003 Aug;6(8):758–72.
 194. Snider RM, Constantine JW, Lowe JA 3rd, Longo KP, Lebel WS, Woody HA, et al. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science*. 1991 Jan;251(4992):435–7.
 195. Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, et al. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors

- attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology*. 2000 Jun;39(8):1413–21.
196. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*. 1998 Sep;281(5383):1640–5.
 197. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. 1998 Feb;32(1):1–49.
 198. Rupniak NM, Kramer MS. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Dec;20(12):485–90.
 199. Bubak AN, Como CN, Blackmon AM, Fietze S, Mescher T, Jones D, et al. Varicella Zoster Virus Induces Nuclear Translocation of the Neurokinin-1 Receptor, Promoting Lamellipodia Formation and Viral Spread in Spinal Astrocytes. *J Infect Dis*. 2018 May;
 200. Martín-Lacave I, García-Caballero T. Atlas de inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales. Ediciones Díaz de Santos; 2012.
 201. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Collins GS. New Guideline for the Reporting of Studies Developing, Validating, or Updating a Multivariable Clinical Prediction Model: The TRIPOD Statement. *Adv Anat Pathol*. 2015 Sep;22(5):303–5.
 202. Chen X-Y, Ru G-Q, Ma Y-Y, Xie J, Chen W-Y, Wang H-J, et al. High expression of substance P and its receptor neurokinin-1 receptor in colorectal cancer is associated with tumor progression and prognosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:3595–602.
 203. Munoz M, Gonzalez-Ortega A, Covenas R. The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs*. 2010/12/02. 2012;30(2):529–40.
 204. Brener S, Gonzalez-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, et al. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009/06/17. 2009;29(6):2323–9.
 205. Munoz M, Rosso M, Perez A, Covenas R, Rosso R, Zamarriego C, et al. Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005/06/28. 2005;46(7):2567–70.
 206. Munoz M, Covenas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in

- pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014/03/08. 2014;20(9):2321–34.
207. Munoz M, Gonzalez-Ortega A, Rosso M, Robles-Frias MJ, Carranza A, Salinas-Martin M V, et al. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*. 2012/10/03. 2012;38(2):318–25.
208. Gonzalez-Ortega A, Sanchez-Vaderrabanos E, Ramiro-Fuentes S, Salinas-Martin M V, Carranza A, Covenas R, et al. Uveal melanoma expresses NK-1 receptors and cyclosporin A induces apoptosis in human melanoma cell lines overexpressing the NK-1 receptor. *Peptides*. 2014/02/20. 2014;55:1–12.
209. Covenas R, Munoz M. Cancer progression and substance P. *Histol Histopathol*. 2014/02/19. 2014;29(7):881–90.
210. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*. 1993 Sep;365(6445):403–6.
211. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992 Oct;17(10):383–7.
212. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep;97(20):11086–91.
213. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997 Nov;390(6655):88–91.
214. Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:511–34.
215. Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ. Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence. *J Neurosci*. 1999 Jan;19(1):56–63.
216. Moore CAC, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:451–82.
217. Nemanqani DM, Aftab K, Al-Malki SH, Al-Sufyani WM. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Colorectal Adenocarcinoma and its Correlation with Clinicopathological Factors. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2018 Jul;28(7):527–31.
218. Munoz M, Rosso M, Robles-Frias MJ, Salinas-Martin M V, Rosso R, Gonzalez-Ortega A, et al. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest*. 2010/05/12. 2010;90(8):1259–69.

219. Munoz M, Recio S, Rosso M, Redondo M, Covenas R. The antiproliferative action of [D-Arg(1), D-Phe(5), D-Trp(7,9), LEU(11)] substance P analogue antagonist against small-cell- and non-small-cell lung cancer cells could be due to the pharmacological profile of its tachykinin receptor antagonist. *J Physiol Pharmacol*. 2015/06/19. 2015;66(3):421–6.
220. Munoz M, Rosso M, Gonzalez A, Saenz J, Covenas R. The broad-spectrum antitumor action of cyclosporin A is due to its tachykinin receptor antagonist pharmacological profile. *Peptides*. 2010/06/15. 2010;31(9):1643–8.
221. Bulavin D V, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet*. 2002 Jun;31(2):210–5.
222. Lin AW, Lowe SW. Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr;98(9):5025–30.
223. Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon GJ, et al. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(10):3497–508.
224. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005 Aug;436(7051):642.
225. Ding H-F, Fisher DE. Induction of apoptosis in cancer: new therapeutic opportunities. *Ann Med*. 2002;34(6):451–69.
226. Castro-Obregon S, Rao R V, del Rio G, Chen SF, Poksay KS, Rabizadeh S, et al. Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *J Biol Chem*. 2004 Apr;279(17):17543–53.
227. Feng F, Yang J, Tong L, Yuan S, Tian Y, Hong L, et al. Substance P immunoreactive nerve fibres are related to gastric cancer differentiation status and could promote proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cell Biol Int*. 2010/11/26. 2011;35(6):623–9.
228. Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A, Salinas-Martin M V, de Agustin Asencio JC, et al. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2014/01/15. 2014;60(5):985–94.
229. Gonzalez Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Esteban F, Gil-Montoya JA, Diaz-Franco MA, Delgado M, et al. Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK-1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol*. 2008/05/20. 2008;44(12):1127–33.
230. Munoz M, Gonzalez-Ortega A, Salinas-Martin M V, Carranza A, Garcia-Recio S,

- Almendo V, et al. The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *Int J Oncol*. 2014/09/02. 2014;45(4):1658–72.
231. Walsh DA, Hu DE, Mapp PI, Polak JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. *Histochem J*. 1996 Nov;28(11):759–69.
232. Munoz M, Covenas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci*. 2015/05/13. 2015;40(2):441–63.
233. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004 Oct;6(4):409–21.
234. Liu B, Lu K-Y. Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2002 Aug;1(3):469–76.
235. Hirai I, Kimura W, Ozawa K, Kudo S, Suto K, Kuzu H, et al. Perineural invasion in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2002 Jan;24(1):15–25.
236. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009 Aug;115(15):3379–91.
237. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Nov;27(31):5131–7.
238. Ceyhan GO, Demir IE, Altintas B, Rauch U, Thiel G, Muller MW, et al. Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep;374(3):442–7.
239. Li X, Ma G, Ma Q, Li W, Liu J, Han L, et al. Neurotransmitter substance P mediates pancreatic cancer perineural invasion via NK-1R in cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2013/01/25. 2013;11(3):294–302.
240. Gillespie E, Leeman SE, Watts LA, Coukos JA, O'Brien MJ, Cerda SR, et al. Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011/10/05. 2011;108(42):17420–5.
241. Weiser MR, Landmann RG, Kattan MW, Gonen M, Shia J, Chou J, et al. Individualized prediction of colon cancer recurrence using a nomogram. *J Clin Oncol*. 2008 Jan;26(3):380–5.
242. Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski A. Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review).

- Folia Neuropathol. 2007/09/13. 2007;45(3):99–107.
243. Ruiz-López PM, Rodríguez-Cuéllar E, Alcalde J, Landa I, Jaurieta E. Informe sobre el Proyecto Nacional para la Gestión Clínica de Procesos Asistenciales. Tratamiento quirúrgico del cáncer colorrectal (II). Desarrollo de la vía clínica. Cir Esp [Internet]. 2003;74(4):206–20. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselp&AN=S0009739X03722258&site=eds-live>
 244. Renfro LA, Grothey A, Xue Y, Saltz LB, Andre T, Twelves C, et al. ACCENT-based web calculators to predict recurrence and overall survival in stage III colon cancer. J Natl Cancer Inst. 2014 Dec;106(12).
 245. Moriya Y, Hojo K, Sawada T, Koyama Y. Significance of lateral node dissection for advanced rectal carcinoma at or below the peritoneal reflection. Dis Colon Rectum. 1989 Apr;32(4):307–15.
 246. Chiang J-M, Chen M-C, Changchien CR, Chen J-S, Tang R, Wang J-Y, et al. Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma: patients 30 years of age or younger may be a distinct patient group. Dis Colon Rectum. 2003 Jul;46(7):904–10.
 247. Paulson EC, Wirtalla C, Armstrong K, Mahmoud NN. Gender influences treatment and survival in colorectal cancer surgery. Dis Colon Rectum. 2009 Dec;52(12):1982–91.
 248. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. Dan Med J. 2012 Jun;59(6):A4444.
 249. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? Ann Surg Oncol. 2008 Sep;15(9):2388–94.
 250. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. Dis Colon Rectum. 2010 Jan;53(1):57–64.
 251. Morrison WB. Inflammation and cancer: a comparative view. J Vet Intern Med. 2012;26(1):18–31.
 252. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature. 2008 Jul;454(7203):436–44.
 253. Meshki J, Douglas SD, Lai J-P, Schwartz L, Kilpatrick LE, Tuluc F. Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. J Biol Chem. 2009

- Apr;284(14):9280–9.
254. Munoz M, Covenas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids*. 2014/04/08. 2014;46(7):1727–50.
 255. Stander S, Siepmann D, Herrgott I, Sunderkotter C, Luger TA. Targeting the neurokinin receptor 1 with aprepitant: a novel antipruritic strategy. *PLoS One*. 2010 Jun;5(6):e10968.
 256. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb;123(3191):309–14.
 257. Medrano S, Gruenstein E, Dimlich R V. Substance P receptors on human astrocytoma cells are linked to glycogen breakdown. *Neurosci Lett*. 1994 Feb;167(1–2):14–8.
 258. Jones S, Tucker KL, Sage T, Kaiser WJ, Barrett NE, Lowry PJ, et al. Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation. *Blood*. 2008 Jan;111(2):605–12.
 259. Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, Preskorn SH, Rothschild AJ, Snavely D, et al. Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Feb;29(2):385–92.
 260. Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W, Dastyk J. HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. *J Immunol*. 2008 Aug;181(3):1665–72.
 261. Koh Y-H, Tamizhselvi R, Bhatia M. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase, through nuclear factor-kappaB and activator protein-1, contribute to caerulein-induced expression of substance P and neurokinin-1 receptors in pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar;332(3):940–8.
 262. Munoz M, Munoz MF, Ayala A. Immunolocalization of Substance P and NK-1 Receptor in ADIPOSE Stem Cells. *J Cell Biochem*. 2017 Dec;118(12):4686–96.
 263. Jensen DD, Lieu T, Halls ML, Veldhuis NA, Imlach WL, Mai QN, et al. Neurokinin 1 receptor signaling in endosomes mediates sustained nociception and is a viable therapeutic target for prolonged pain relief. *Sci Transl Med*. 2017 May;9(392).
 264. Wang J, Elahi A, Ajidahun A, Clark W, Hernandez J, Achille A, et al. The interplay between histone deacetylases and c-Myc in the transcriptional suppression of HPP1 in colon cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014 Sep;15(9):1198–207.
 265. Rosso M, Munoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*. 2012/05/01. 2012;2012:381434.

ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I: CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

**Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica**

C.P. Tesis_SP_Colon - C.I. 0499-N-18

20 de abril de 2018

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

CERTIFICA

1º. Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 22/03/2018, acta 04/2018 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: Estudio inmunohistoquímico sobre la expresión y distribución de la sustancia P y del Receptor NK1 en el Cáncer Colorrectal (Estudio SPaCCio).

Código Promotor: Tesis_SP_Colon **Código Interno:** 0499-N-18

Promotor: Investigador

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEI acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEI/Centros por los Investigadores:

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Carlos Escudero Severín
Hospital San Juan de Dios

Lo que firmo en Sevilla, a 20 de abril de 2018

Fdo:

SANCHEZ
MARGALET
VICTOR
MANUEL -
28691159Q

Firmado
digitalmente por
SANCHEZ
MARGALET VICTOR
MANUEL -
28691159Q
Fecha: 2018.04.20
13:49:18 +02'00'

Dr. Víctor Sánchez Margalet
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

9.2 ANEXO II: TABLA DE DEFINICIÓN DE VARIABLES.

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Diagnóstico histopatológico	Diagnóstico registrado por el patólogo responsable del estudio original de la pieza quirúrgica.	Independiente	Cualitativa politómica	Texto libre	Muestra microscópica
Tamaño tumoral	Tamaño a nivel macroscópico del tumor medido en centímetros sobre la pieza quirúrgica. Se mide en dos ejes y se toma la mayor	Independiente	Cuantitativa continua	Longitud del eje máximo del tumor en cm	Muestra macroscópica
Presencia de ulceración	Presencia de ulceración en la superficie del tumor, definida por la presencia de material fibrino-leucocitario.	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Grado histológico		Independiente	Cualitativa politómica	1= más del 95% de formación de glándulas (bien diferenciado); 2= entre el 50-95% de formación de glándulas (moderadamente diferenciado); 3= menos del 50% de formación de glándulas (pobremente diferenciado); 4= No forma glándulas o mucina; diferenciación escamosa o neuroendocrina (Indiferenciado)	Muestra microscópica
Inflamación peritumoral	Presencia de células inflamatorias en el tejido que rodea el tumor	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Márgenes quirúrgicos	Afectación de los márgenes quirúrgico por el tumor	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Invasión perineural	Presencia de células tumorales alrededor de las estructuras nerviosas	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Invasión vascular	Presencia de células tumorales alrededor de las estructuras vasculares	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Invasión en vecindad	Presencia de células tumorales en estructuras vecinas abdominales y pélvicas	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Adenopatías	Presencia de adenopatías en la grasa pericólica y/o del meso en las que se objetiva la existencia de metástasis tumoral	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Número de adenopatías	Número de adenopatías afectadas. Se expresara mediante una razón en la que el numerador expresa el número de ganglios afectados y el denominador el número de ganglios extraídos de la pieza quirúrgica (se considera que el número de ganglios óptimo que deben haberse extraído	Independiente	Cuantitativa continua	Razón de adenopatías afectadas divididas por el número total de adenopatías extraídas	Muestra microscópica

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
	junto a la pieza quirúrgica es de 12 para que se considere una resección tumoral adecuada).				
Extensión extracapsular	Presencia de células tumorales por fuera de la cápsula ganglionar	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Depósitos tumorales	Presencia de acúmulo de células tumorales en la grasa pericóluica o del meso sin relación con estructuras del tejido linfoide.	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	Muestra microscópica
Número de depósitos tumorales	Presencia de agregados de células tumorales localizados en tejido no linfoide (grasa perivisceral, epiplon, serosa peritoneal, etc.)	Independiente	Cuantitativa continua	Número de depósitos	Muestra microscópica
Tamaño patológico	Es el tamaño del tumor medido en centímetros.	Independiente	Cualitativa politómica	Puntuación según la CAP, AJCC	Muestra microscópica

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Adenopatías patológicas	Valora la afectación de los ganglios linfáticos pericolónicos y el número de ganglios afectados por el tumor del total de ganglios estudiados (oscila desde 0 hasta más de 7)	Independiente	Cualitativa politómica	Puntuación según la CAP, AJCC	Muestra microscópica
Adenopatías clínicas	Valora la afectación de los ganglios linfáticos en las pruebas de imagen	Independiente	Cualitativa politómica	Puntuación según la CAP, AJCC	Muestra microscópica
Metástasis clínicas	Valora la presencia de lesiones tumorales alejadas del tumor principal en las pruebas de imagen, en especial en el hígado y en el pulmón	Independiente	Cualitativa politómica	Puntuación según la CAP, AJCC	Muestra microscópica
Estadio TNM	Se calcula mediante la combinación de los parámetros visto: localización del tumor primario, valoración de los ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis a distancia	Independiente	Cualitativa politómica	Puntuación según la CAP, AJCC	Muestra microscópica
Puntuación Intensidad SP	Ver método Escala de Allred	Independiente	Ordinal	Puntuación de Allred	Muestra microscópica
Puntuación Distribución SP	Ver método Escala de Allred	Independiente	Ordinal	Puntuación de Allred	Muestra microscópica

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Puntuación Global Allred SP	Ver método Escala de Allred	Independiente	Ordinal	Puntuación de Allred	Muestra microscópica
Puntuación Intensidad NK1R	Ver método Escala de Allred	Independiente	Ordinal	Puntuación de Allred	Muestra microscópica
Puntuación Distribución NK1R	Ver método Escala de Allred	Independiente	Ordinal	Puntuación de Allred	Muestra microscópica
Puntuación Global Allred NK1R	Ver método Escala de Allred	Independiente	Ordinal	Puntuación de Allred	Muestra microscópica
Inestabilidad de microsatélites	Expresión inmunohistoquímica de los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2; relacionados con la reparación de los errores de síntesis del DNA. Si pierde la proteína reparadora (tinción negativa) la prueba se considera positiva para la inestabilidad de microsatélite.	Independiente	Cualitativa dicotómica	Negativo= 0 (no existe IMS) Positiva= 1 (existe IMS)	Muestra microscópica
Fecha diagnóstico clínico	Fecha en la que se registra por primera vez en la historia clínica el diagnóstico de cáncer de colon	Intermedia	Cuantitativa continua	Fecha (dd/mm/aaaa)	DIRAYA AP y AE
Diagnóstico clínico		Independiente	Cualitativa politómica	Texto libre	DIRAYA AP y AE

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Exitus	Fallecimiento del paciente	Dependiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	DIRAYA AP y AE
Fecha de exitus	Fecha de la defunción	Intermedia	Cuantitativa continua	Fecha (dd/mm/aaaa)	DIRAYA AP y AE
Causa del exitus	Motivo que causó la muerte. Para considerar muerte por el tumor la causa inmediata o intermedia debe estar relacionada con éste	Independiente	Cualitativa politómica		
Supervivencia	Diferencia en meses entre la fecha de exitus y la del diagnóstico clínico	Dependiente	Cuantitativa continua	meses	DIRAYA AP y AE
Quimioterapia	Ha recibido quimioterapia adyuvante y/o neoadyuvante	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	DIRAYA AP y AE
Antígeno CEA al año de operarse	Concentración plasmática de antígeno carcinoembrionario al año de haberse operado	Independiente	Cuantitativa continua	Valor de laboratorio en ng/dl	DIRAYA AP y AE
Antígeno CEA al 2º año de operarse	Concentración plasmática de antígeno carcinoembrionario a los 2 años de haberse operado	Independiente	Cuantitativa continua	Valor de laboratorio en ng/dl	DIRAYA AP y AE
Antígeno CEA al 3er año de operarse	Concentración plasmática de antígeno carcinoembrionario a los 3 años de haberse operado	Independiente	Cuantitativa continua	Valor de laboratorio en ng/dl	DIRAYA AP y AE

Variable	Definición Conceptual	Tipo	Naturaleza	Definición Operativa	Fuente de datos
Antígeno CEA al 4º año de operarse	Concentración plasmática de antígeno carcinoembrionario a los 4 años de haberse operado	Independiente	Cuantitativa continua	Valor de laboratorio en ng/dl	DIRAYA AP y AE
Antígeno CEA al 5º año de operarse	Concentración plasmática de antígeno carcinoembrionario a los 5 años de haberse operado	Independiente	Cuantitativa continua	Valor de laboratorio en ng/dl	DIRAYA AP y AE
Dehiscencia de sutura	Evento adverso postquirúrgico que consiste en la dehiscencia o pérdida de continuidad de la anastomosis entre los bordes de resección intestinal.	Independiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	DIRAYA AP y AE
Recidiva local	Aparición de un tumor de similares características al inicial que aparece en la zona cercana a la anastomosis y que ocurre a medio-largo plazo desde la resección inicial	Dependiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	DIRAYA AP y AE
Metástasis a distancia	Presencia de metástasis del tumor de colon en un órgano distante (hígado, pulmón, principalmente)	Dependiente	Cualitativa dicotómica	No= 0; Sí= 1	DIRAYA AP y AE
Localización de metástasis	Localización de las metástasis a distancia	Independiente	Cualitativa politómica	Texto libre	DIRAYA AP y AE

